

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE MEDICINA



TESIS DOCTORAL

Bases moleculares de las neoplasias mieloproliferativas crónicas filadelfia negativas

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

Gonzalo Carreño Gómez-Tarragona

DIRECTORES

Rosa Ayala Díaz
Miguel Manzanares Fourcade
Joaquín Martínez López

© Gonzalo Carreño Gómez-Tarragona, 2021

Universidad Complutense de Madrid

Facultad de Medicina

Programa de Doctorado en Investigación en Ciencias Médico-Quirúrgicas

Departamento de Medicina



Tesis Doctoral

**Bases Moleculares de las Neoplasias Mieloproliferativas Crónicas
Filadelfia Negativas**

Memoria para optar al Grado de Doctor presentada por
Gonzalo Carreño Gómez-Tarragona

Directores

Rosa Ayala Díaz

Miguel Manzanares Fourcade

Joaquín Martínez López

Madrid, 2020

BASES MOLECULARES DE LAS NEOPLASIAS MIELOPROLIFERATIVAS CRÓNICAS FILADELFIA NEGATIVAS

GONZALO CARREÑO GÓMEZ-TARRAGONA

Madrid, 2020

Universidad Complutense de Madrid
Facultad de Medicina
Programa de Doctorado en Investigación en Ciencias Médico-Quirúrgicas
Departamento de Medicina



Doña Rosa Ayala Díaz, Profesora Asociada del Departamento de Medicina de la Universidad Complutense de Madrid y Jefa de Sección del Servicio de Hematología del Hospital Universitario 12 de Octubre.

Don Miguel Manzanares Fourcade, Científico Titular del Centro Superior de Investigaciones Científicas y Jefe del grupo de Genómica Funcional del Centro de Biología Molecular Severo Ochoa.

Don Joaquín Martínez López, Profesor Titular del Departamento de Medicina de la Universidad Complutense de Madrid y Jefe de Servicio del Servicio de Hematología del Hospital Universitario 12 de Octubre.

CERTIFICAN: Que la Tesis Doctoral realizada bajo nuestra dirección por Don Gonzalo Carreño Gómez-Tarragona titulada ‘Bases Moleculares de las Neoplasias Mieloproliferativas’ reúne las condiciones de originalidad y rigor científico requeridos encontrándola apta para su presentación, lectura y defensa como Tesis Doctoral ante el tribunal que en su día se designe.

Y para que así conste donde proceda, firman el presente documento en Madrid, a 1 de septiembre de 2020.



Dra. Rosa Ayala Díaz Dr. Miguel Manzanares Fourcade Dr. Joaquín Martínez López

'Mi consejo a los estudiantes de ciencia es que si desean ardientemente investigar, deberían hacerlo por todos los medios. Nada debería interponerse al deseo intenso de dedicar la vida a la Ciencia. Si tienes el anhelo de llevar a cabo investigación científica adquiere el aprendizaje preciso y por todos los medios hazlo. Difícilmente alguna otra cosa te dará tanta satisfacción y, sobre todo, tal sentido de logro'

Severo Ochoa

A mis abuelos Antoñita, Carmina, Pepe y Ramón.
Gracias por indicarme el camino.

A Raquel. Gracias por acompañarme y ser mi brújula.

A Miguelito (¡y los que vengan!). Eres (sois) el mejor destino.

Agradecimientos

Bueno, pues parece que después de años y años... ¡Por fin ha llegado esta Tesis! Todos los que me conocéis bien sabéis que llevo toda la vida queriendo hacer Ciencia, dedicarme a 'la cultura de la duda'. Ello no ha estado exento de sacrificios y es por esto que tengo muchísimo que agradecer a muchas personas. Probablemente a más de las que incluya en estas líneas. De hecho, si hay algo más emocionante en Investigación que aprender, descubrir y, por qué no decirlo, conseguir publicar, es la oportunidad de conocer, colaborar y disfrutar de múltiples personas.

Por empezar estos agradecimientos de una forma académica, comenzaré por mis directores de tesis. Por el orden en que os conocí: Miguel, Joaquín y Rosa.

Miguel, qué te voy a decir que no te haya dicho ya en nuestras largas conversaciones en ese despacho cuyo póster 'I want to believe' nunca llegué a ver colgado. Jamás podré agradecerte lo suficiente que aceptases en tu laboratorio a un estudiante de Medicina que poco más podía ofrecer que su entusiasmo y ganas de aprender de genómica y biología del desarrollo. Durante estos años hemos compartido infinidad de momentos (algunos difíciles) en los cuales he aprendido, reído, debatido y hasta comido (¡qué buen ojo para los restaurantes!). Gracias por ayudarme a ampliar mis horizontes y, sobretodo, por esa capacidad para hacerme soñar.

Joaquín, ya cuando te escribí un correo antes de escoger mi plaza MIR me advertiste que simultanear la actividad asistencial y la investigación sería complicado pero que tendría todo tu apoyo. Por suerte, tengo un jefe que comparte conmigo la necesidad de investigar para mejorar la vida de nuestros pacientes. Tengo que agradecerte hacer posible esta tesis y tu infinita fe en cualquiera de mis proyectos. Gracias por creer siempre en mí, por todos esos 'si crees que merece la pena, adelante' y por enseñarme lo lejos que el tesón y

el trabajo duro pueden llevarme. Gracias también por impulsarme siempre a dar un paso más, ya sea como médico o como científico. Gracias por fijarte siempre en lo mejor para mi carrera profesional y por brindarme la mejor de las oportunidades para desarrollarme profesional y familiarmente.

Por último, y no por ello menos importante, Rosa, mi jefa y compañera. Los sueños, el trabajo y la fe nunca hubiesen dado frutos sin tu ayuda. Gracias por ayudarme a centrar los problemas e hipótesis, por enseñarme a administrar esfuerzos. Gracias por darme el tiempo y la libertad necesarios para llevar a cabo esta tesis. He crecido gracias a tu generosidad. Gracias por animarme siempre pero no dejar nunca de decirme la verdad. Y sobre todo, gracias por ayudarme a ser el hematólogo que soy hoy.

Pero este trabajo no hubiese salido adelante sin la ayuda de multitud de gente, para empezar mis compañeros del CNIC. Gracias chicos por hacerme todo fácil, por animarme cuando aparecía saliente de guardia a continuar con un 4C, por celebrar los días que comía con vosotros, por todo lo que me habéis enseñado, por mostrar más entusiasmo e ideas que yo en este proyecto. Con vosotros la Ciencia siempre es divertida y hasta los experimentos fallidos merecen la pena. Raquel, sin ti jamás hubiese podido estudiar nuestro querido haplotipo 46/1, gracias por tu paciencia, por tu metódica, por tu cariño en cada cosa que haces. Jesús, gracias por mantener este proyecto vivo, pero sobre todo gracias por tu sentido del humor. A todos con los que convivido en ese lugar idílico que es el Manzanares' lab: Luis, Eva, Alba, Cristina, Aurora, Elena, Inma, María, Marta, Claire, Isa... Mariajo, gracias por ser un ejemplo en todo. Melisa, Sergio, Teresa, Julio y Antonio, gracias por las mejores sobremesas de siempre, por destilar sabiduría y gracejo. Claudio, eres un grande. A los bioinformáticos y estadísticos: Belén, Carlos, Fátima, José Manuel, Jorge y Juan Carlos, muchas gracias.

Si continuamos con los compañeros del Hospital la lista no es menor. Inma, no se puede ser mejor compañera, me has ayudado y escuchado hasta la saciedad. Gracias por hacer que todo funcione en el laboratorio y por tus infinitos conocimientos que abarcan la química, la biología, la clínica y hasta las momias. A mis compañeras de despacho, ¡ya sabéis lo que os he hecho de menos! Alejandra, gracias por estar siempre disponible, por ayudarme a sortear, por escuchar mis problemas y para que engañarnos, gracias por los cotilleos y, todavía más importante, ¡la comida! Laura, eres la otra miembro de nuestro foodie's lab. Gracias por cuidarme, alimentarme, enseñarme y por esa sonrisa perpetua. Isa, aunque no me has confesado el secreto de tu eterna juventud sí que me has enseñado el de la felicidad: tu energía, sentido del humor y curiosidad infinita. Gracias por toda tu ayuda.

To Nick. I never imagined that I'd spent one of the happiest times of my life in Salisbury; probably because I didn't expect to find such a good scientist, boss and friend. Thank you for the amazing opportunity you gave me, for introducing me to your family, showing me England and even teaching me cricket! Hopefully our collaborations will remain fruitful and our paths will cross over and over again. Andy, you are not only one of the best molecular biologists I'll ever meet but one of the best persons I've known. You being my supervisor and friend is one of my greatest honors. Let's see if we all manage to unravel 46/1 function!

A Nuria, Ángel, Luis, Miriam y Mamen. Fuisteis mis profesores, después mis jefes y ahora mis amigos. Nuria y Luis, gracias por dejarme la puerta siempre abierta. Ángel, ¡qué te voy a decir si salvas mi matrimonio día a día cuidando de mi cangrejo de herradura! Gracias por ser genial. Soy el científico y médico que soy gracias a vosotros. No se puede expresar con palabras el sueño que es trabajar y aprender de vosotros, pero sí que

puedo prometeros seguir compartiendo anécdotas, gamba blanca y margaritas hasta el fin de los tiempos.

To Leila and Stefan. Thank you for your kindness and highly efficient work. Without your help many questions in this thesis would had remained unanswered. I hope our collaboration will keep answering the rest of them.

Gracias José Luis y Alejandro por vuestra disponibilidad a la hora de modelar el haplotipo, por contestar mis recurrentes y largos correos. ¡Ojalá algún día nos conozcamos en persona!

Al resto del laboratorio de biología molecular del 12 de Octubre. Richard, no se puede ser mejor persona, gracias por estar ahí siempre. A Antonio, porque las largas conversaciones a horas intempestivas no tienen precio. A Almu, Mariluz, Alba, María, Santi, Miguel, Alicia, Jessi, Elena, Esther, Yanira y José Manuel gracias por vuestra ayuda contra viento y marea. A las técnicas, Marijose, Merche, Paqui, Paloma, Blanca (mi ojito derecho), Inés, Ali, Vane, Xandra y las Lauras, sin vosotras no habría sido capaz de hacer ni una extracción de DNA, gracias por vuestras manos, vuestras pipetas y, sobretodo, vuestro cariño.

A mis compañeras actuales Gloria y Sandra. ¡Qué suerte poder ir contento a trabajar! Gran parte de ello es gracias a vosotras. Gracias por apoyarme siempre y vuestra flexibilidad infinita para que pueda llevar a cabo mis investigaciones. Gracias también por enseñarme y cuidarme.

Gracias a todos los laboratorios que me acogieron y enseñaron en su momento. Gracias a Roberto y a Rafa por darme mi primera oportunidad en investigación. Gracias a Miguel, Paula, Alvarito, Lucía, Esther, Vero, Susana, Rosana, Cristina y Belén. Thank you, Lynn, and thank you Marella for my first international experiences in Philly and Oxford. Thank you, Yvette, Lin, Matt and Kathy, for your help in Salisbury.

Gracias a mis residentes, mayores y menores. José María, Mario, José, Denis, Tere, Leyre, Cris, Alvarito, Rodri, Xabi, Ventu (¡ahora compañero citólogo!), Nieves, Marta y Elena. Xabi y Nieves, sin vuestra ayuda esta tesis no tendría ni la mitad de datos clínicos, ¡mil gracias! Sé que llevo meses prometiéndolo... ¡pero esas publicaciones llegarán!

A todos mis adjuntos, ahora compañeros. Gracias por enseñarme a ser hematólogo, pero sobre todo médico.

Reyes, gracias por tu apoyo, tu sentido del humor ¡y las chuches!

Gracias también a mis compañeros del GEMFIN por vuestra sabiduría y confianza.

A mis pacientes. Espero que algún día mis esfuerzos se vean recompensados en vosotros.

A mis amigos Rebe, Leyre, Vicky y Pipe. A Kike y Juan. Gracias por disfrutar de mis aficiones y vicios tanto o más que yo. ¡Qué buena familia escogí!

A mis suegros, Elena y Luis y a mi cuñado David, por ser unos segundos padres y hermano. Sin vuestra ayuda con absolutamente todo no estaría donde estoy.

A mis padres y mi hermana, por dar rienda suelta a mi curiosidad. A mis abuelos, tíos y primos, por celebrar cada pequeño éxito como una gran gesta. Dani, gracias por darle forma, literalmente, a esta tesis.

Raquel, hemos crecido juntos. Sólo tú sabes la ilusión que me hace esto y lo que nos ha costado. Esta tesis es tuya también. Gracias por quererme y por compartir conmigo los momentos duros, pero también los más felices. Gracias por tu paciencia y por apoyarme en mis sueños, pero sobretodo gracias por darme el mejor regalo, nuestra familia.

ÍNDICE

RESUMEN.....	21
ABSTRACT	27
INTRODUCCIÓN.....	33
1. Las Neoplasias Mieloproliferativas.....	34
2. Las Neoplasias Mieloproliferativas Filadelfia Negativas Clásicas.....	37
2.1 Policitemia Vera.....	37
2.2 Trombocitemia Esencial.....	40
2.3 Mielofibrosis Primaria.....	43
3. Fisiopatología Molecular de las Neoplasias Mieloproliferativas.....	48
3.1 Mutaciones <i>driver</i> de NMP.....	48
3.1.1 JAK2.....	49
3.1.2 CALR.....	50
3.1.3 MPL.....	50
3.2 Otras mutaciones presentes en NMP.....	51
4. Riesgo molecular de las Neoplasias Mieloproliferativas.....	53
4.1 Riesgo molecular en Policitemia Vera.....	53
4.2 Riesgo molecular en Trombocitemia Esencial.....	53
4.3 Riesgo molecular en Mielofibrosis Primaria.....	54
5. Herencia de las Neoplasias Mieloproliferativas.....	56
5.1 Neoplasias Mieloproliferativas Familiares.....	57
5.2 Predisposición Común a padecer Neoplasias Mieloproliferativas.....	58
5.2.1 El Haplotipo 46/1 de JAK2.....	59
5.3 Eritrocitosis y Trombocitosis Familiares.....	61

5.3.1 Eritrocitosis Familiar.....	61
5.3.2 Trombocitosis Familiar.....	62
6. La genómica en el siglo XXI: de la secuencia a la función y del laboratorio a la clínica. Herramientas para diagnosticar, pronosticar conocer la biología de las Neoplasias Mieloproliferativas.....	65
HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....	67
1. Justificación.....	68
2. Hipótesis de Trabajo.....	69
3. Objetivos.....	70
MATERIALES Y MÉTODOS.....	73
1. Pacientes.....	74
2. Extracción de DNA y RNA.....	78
2.1 Extracción de ácidos nucleicos mediante columnas y elución.....	78
2.2 Extracción de DNA automatizada con bolas magnéticas.....	78
3. Transcripción Reversa para la obtención de cDNA.....	79
4. PCR cuantitativa.....	80
5. Secuenciación Sanger.....	81
6. Estudio de un Panel de Genes implicados en patología Mieloide por Secuenciación de Nueva Generación (NGS).....	82
6.1 Diseño de Amplicones.....	82
6.2 Generación de Librerías.....	84
6.3 Amplificación de la Librería en partículas magnéticas.....	86
6.4 Secuenciación y obtención de datos.....	86

6.5 Análisis final y selección de variantes.....	86
7. Haplotipado.....	88
8. Separación celular mediante gradiente con Ficoll.....	91
9. Separación celular por citometría (<i>Sorting</i>).....	92
10. Caracterización Funcional de Mutantes de JAK2 y MPL.....	94
10.1 cDNA.....	94
10.2 Ensayos Duales de Actividad de Luciferasa.....	94
10.3 Estudios de Proliferación.....	95
11. Secuenciación completa de exomas.....	97
11.1 Control de Calidad de las muestras.....	97
11.2 Fragmentación del DNA, preparación y control de calidad de las librerías.....	97
11.3 Captura, enriquecimiento y control de calidad de las librerías capturadas.....	98
11.4 Secuenciación.....	98
11.5 Análisis Bioinformático.....	98
11.6 Análisis de Variantes.....	99
12. Captura Circularizada de la Conformación Cromosómica: 4C-seq.....	100
12.1 Diseño de <i>Viewpoints</i>	102
12.2 Obtención de muestras y cromatina circularizada.....	106
12.3 Preparación de las Librerías.....	106
12.4 Secuenciación de las Librerías.....	107
12.5 Análisis de datos del 4C-seq.....	108

12.5.1 Normalización de Lecturas.....	108
12.5.2 Estimación Estadística de las Interacciones.....	108
13. Modelado 3D de la cromatina a partir de datos del 4C-seq: 4Cin.....	110
14. Estadística.....	111

RESULTADOS.....113

1. Utilidad de un panel NGS de genes implicados en patología mieloide en el diagnóstico y pronóstico de las Neoplasias Mieloproliferativas.....	114
1.1 El perfil mutacional y su interpretación ayuda a discriminar entre pacientes con y sin patología mieloide.....	114
1.2 Características de los pacientes con Neoplasias Mieloproliferativas Clásicas.....	116
1.3 Efecto del perfil mutacional en la Mortalidad y Supervivencia Global de las Neoplasias Mieloproliferativas Clásicas.....	120
1.4 Efecto del perfil mutacional en la Progresión y Supervivencia Libre de Progresión de las Neoplasias Mieloproliferativas Clásicas.....	123
1.5 Efecto del perfil mutacional en la aparición de Trombosis y Supervivencia Libre de Trombosis.....	127
1.6 Efecto del perfil mutacional en la aparición de Eventos y Supervivencia Libre de Evento de las Neoplasias Mieloproliferativas Clásicas.....	129
1.7 Estudio de pacientes con Trombocitemia Esencial Triple Negativa.....	131
2. Identificación de mutaciones no canónicas en genes <i>driver</i> de Neoplasias Mieloproliferativas.....	136

3. La mutación S505C de MPL incrementa la actividad constitutiva de los mutantes W515 de MPL.....	139
4. La mutación germinal R683G de JAK2 ocasiona un cuadro de Trombocitosis Familiar con esplenomegalia y trombosis.....	143
4.1 Características clínicas y secuenciación.....	143
4.2 Caracterización de la mutación R683G de JAK2	144
4.3 Exomas en la familia a estudio.....	146
5. Uso de secuenciación completa del exoma (WES) para la identificación de genes candidatos causantes de Neoplasias Mieloproliferativas.....	148
6. Caracterización funcional del Haplotipo 46/1 de JAK2 y su implicación en la etiopatogenia de las Neoplasias Mieloproliferativas.....	152
6.1 Descripción de las diferencias entre haplotipos usando datos del estudio PESA: características clínicas, analíticas, transcriptómicas y proteómicas.....	152
6.1.1 Características clínicas y bioquímicas.....	154
6.1.2 Hemograma.....	156
6.1.3 Estudio de RNA-seq en células totales de sangre periférica.....	157
6.1.4 Estudio de Proteómica.....	159
6.2 Uso de estudios de Captura Circularizada de la Conformación Cromosómica para estudiar la estructura del Haplotipo 46/1 de JAK2.....	160
6.2.1 Diferencias en interacciones genómicas entre haplotipos.....	160
6.2.2 Modelo tridimensional del Haplotipo 46/1.....	163
6.3 Expresión diferencial de genes de interés en poblaciones celulares de sangre periférica.....	164

DISCUSIÓN.....167

1. Utilidad de un panel NGS de genes implicados en patología mieloide en el diagnóstico de las Neoplasias Mieloproliferativas.....169
2. Papel pronóstico del perfil mutacional en las Neoplasias Mieloproliferativas.172
3. Trombosis: hematopoyesis clonal y Neoplasias Mieloproliferativas.....176
4. Nuevas mutaciones: lecciones sobre la biología de la enfermedad.....179
 - 4.1 Las mutaciones en cis de MPL cooperan en la ganancia de función.....180
5. La mutación germinal R683G de JAK2 como causa de una Trombocitosis Familiar agresiva: papel de la actividad constitucional.....182
6. Las Neoplasias Mieloproliferativas familiares: una causalidad difícil de demostrar.....185
7. Haplotipo 46/1 de JAK2: el papel de las regiones reguladoras.....187
8. Inflamación e inmunidad: el posible papel de PD-L1 en la etiopatogenia de las Neoplasias Mieloproliferativas.....190
9. Integrando un modelo de enfermedad: herencia, inmunidad y adquisición de mutaciones.....194

CONCLUSIONES.....197

BIBLIOGRAFÍA.....201

LISTADO DE TABLAS.....239

LISTADO DE FIGURAS.....243

TERMINOLOGÍA INGLESA.....247

ABREVIATURAS.....251

RESUMEN

Introducción:

las neoplasias mieloproliferativas (NMP) son trastornos clonales de la célula madre hematopoyética caracterizados por la proliferación de una o más líneas mieloides. Dentro de éstas destacan las NMP cromosoma Filadelfia negativas clásicas a saber, Policitemia Vera (PV), Trombocitemia Esencial (TE) y Mielofibrosis Primaria (MFP), con unas características clínicas, morfológicas y moleculares similares. Aunque desde principios de este siglo se han identificado mutaciones *driver* (conductoras) características en los genes JAK2, MPL y CALR, todavía no está bien estudiado el papel que las mutaciones en genes no *driver* juegan en la biología y pronóstico de estas enfermedades. Por último, todavía no se conocen los mecanismos a través de los cuales diversas variantes genéticas identificadas incrementan el riesgo de padecer NMP esporádica ni los genes y mutaciones implicados en NMP familiar y síndromes NMP-*like*.

Hipótesis y Objetivos:

el uso de la secuenciación masiva de nueva generación (NGS) para estudiar paneles de genes implicados en patología mieloide puede ayudarnos a diagnosticar, pronosticar y conocer mejor la biología de las NMP. Además, nuevas técnicas de biología molecular como la secuenciación de exomas o las técnicas de conformación cromosómica pueden ser útiles para estudiar el riesgo genético de padecer NMP esporádica, familiar y síndromes NMP-*like*. Por tanto, los objetivos de esta tesis fueron evaluar la utilidad del estudio de un panel de genes implicados en patología mieloide para el diagnóstico, pronóstico y estudio de la biología de las NMP, caracterizar biológicamente algunas de las mutaciones identificadas, tratar de encontrar mediante secuenciación de exomas variantes causales de NMP familiares y caracterizar funcionalmente el haplotipo 46/1

de JAK2 mediante diversas técnicas, incluida la captura circularizada de conformación cromosómica (4C-seq), para intentar explicar por qué incrementa el riesgo de padecer NMP. Todo ello busca desarrollar un modelo que explique la biología e historia natural de las NMP.

Materiales y Métodos:

se recogieron datos de 140 pacientes con sospecha o diagnóstico de NMP a los que se les había realizado secuenciación de un panel de genes relacionado con patología mielóide entre el 19/06/2016 y el 11/03/2020 (33 genes hasta marzo de 2018, 43 hasta la actualidad). Se realizaron estudios duales de actividad de luciferasa para estudiar la actividad transcripcional de STAT5 y estudios de proliferación para estudiar los efectos de algunas mutaciones detectadas. Se realizó secuenciación de exomas en una familia con trombocitosis familiar y en dos con NMP familiar. Se haplotiparon 509 pacientes del estudio PESA para posteriormente analizar los datos de RNA-seq y proteoma del estudio. Se realizaron experimentos 4C-seq para estudiar el plegamiento e interacciones diferenciales del haplotipo 46/1. Se hicieron qPCRs para medir los niveles de expresión de genes candidatos en células separadas por gradiente y *sorting* por citometría.

Resultados:

se observó una asociación entre presentar mutaciones y padecer alguna patología mielóide a expensas de mutaciones con utilidad clínica y con la presencia de mutaciones en genes de tirosinas cinasas, modificadores epigenéticos y aquellos implicados en *splicing*. En el estudio multivariante por regresión logística solamente la presencia de mutaciones con utilidad clínica se asoció a presentar patología. Los pacientes con NMP y mutaciones en CBL presentaron menor supervivencia. En NMP, se encontró asociación entre

progresión y la presencia de mutaciones por NGS, mutaciones en tirosinas cinasas y sus vías, en genes de modificadores epigenéticos y genes DAT (DNMT3A, ASXL1 y TET2). Los genes asociados fueron ASXL1, CALR y TET2. La presencia de mutaciones clasificadas como con significado clínico también se asoció a progresión, así como el número de mutaciones, esto último en el análisis multivariante. En el análisis de tiempo a progresión, este fue menor en aquellos pacientes con mutaciones detectadas en genes modificadores epigenéticos, mutaciones DAT y a mayor número de mutaciones. En cuanto a trombosis, se encontró asociación entre trombosis y la presencia de mutaciones DAT, TET2 y DNMT3A. En la cohorte global esta asociación se mantuvo en el estudio multivariante con regresión logística para TET2 y DNMT3A a los que se añadió DNMT2A. En la cohorte de NMP solo se encontró asociación de trombosis con la presencia de mutaciones en DNMT3A. Se encontraron 17 mutaciones no canónicas en JAK2, MPL y CALR. Se identificó y caracterizó una doble mutación en *cis* S505C y W515R en MPL observándose que la mutación S505C coopera con las mutaciones W515R/L aumentando la actividad transcripcional de STAT5 y la proliferación de células portadoras. Identificamos una familia con trombocitosis familiar y caracterizamos la mutación con actividad constitutiva JAK2 R6836 como la causal del cuadro. No se identificaron genes causales claros en las dos familias con NMP estudiadas por secuenciación completa del exoma. En cuanto al haplotipo 46/1 no identificamos cambios relevantes en variables clínicas o analíticas ni en el RNA-seq o estudio proteómico de sangre periférica. En cambio, sí se identificaron interacciones diferenciales mediante el estudio de la estructura de la cromatina. Dichas interacciones conllevan un cambio de expresión en JAK2, PD-L2 y, de manera más relevante, PD-L1 en linfocitos.

Conclusiones:

La secuenciación de genes implicados en patología mieloide por NGS tiene utilidad diagnóstica y pronóstica en pacientes con neoplasias mieloproliferativas. Las mutaciones no *driver* influyen en la mortalidad, progresión y trombosis de los pacientes con NMP. Las dobles mutaciones de MPL son capaces de modificar la biología de la enfermedad mientras que a mutación germinal R683G de JAK2 ocasiona una trombocitosis familiar. La herencia en las neoplasias mieloproliferativas familiares es compleja y la identificación de sus variantes causales precisa de pedigrís amplios. El estudio de la estructura tridimensional del genoma nos ha ayudado a identificar la sobreexpresión de PD-L1 como un posible mecanismo a través del cual el haplotipo 46/1 media su efecto.

ABSTRACT

Introduction:

myeloproliferative neoplasms (MPN) are clonal disorders of the haematopoietic stem cell characterized by proliferation of one or more myeloid lineages. Amongst them there are the classical Philadelphia chromosome negative MPN, Polycythemia Vera (PV), Essential Thrombocythemia (ET) and Primary Myelofibrosis (PMF) which share clinical, morphological and molecular characteristics. Despite driver mutations been discovered at the beginning of this century, the role that non-driver mutations play in the biology and prognosis of these disease has still not been studied thoroughly. Finally, the mechanisms through which diverse identified genetic variants increase the risk of suffering sporadic MNP, familial MNP and MPN-like syndromes are still to be elucidated.

Hypothesis and Aims:

the use of next generation sequencing for the study of a panel of genes implicated in myeloid pathology may help us to diagnose, determine prognosis and improve our knowledge about the biology of MPN. In addition, new molecular biology techniques such as whole exome sequencing (WES) or chromosome conformation capture techniques can be useful to study the genetic risk to suffer sporadic MPN, familial MPN or MPN-like syndromes. Therefore, the aims of the thesis were to evaluate the usefulness of the study of a panel of genes implicated in myeloid disorders to diagnose, make prognosis and study the biology of MPN, to biologically characterize a few of the identified mutations, to find by WES variants responsible of familial MPN and functionally characterize the 46/1 haplotype of JAK2 using diverse techniques such as the circularized chromosome conformation capture (4C-seq) in order to try to explain why it increases

the risk of suffering MPN. All this will help us to develop a model to explain the biology and natural history of MPN.

Materials and Methods:

data were collected from 140 patients with suspected or diagnosed MPN who had undergone sequencing of a panel of genes related to myeloid pathology in our center between 19/06/2016 and 11/03/2020 (33 genes panel until March 2018 and 43 genes panel from then until now). We did dual luciferase reporter assays to study STAT5 transcriptional activity and proliferation assays in order to study the effects of some detected mutations. WES was done in a family suffering from familial thrombocytosis and two with familial MPN. We haplotyped 509 patients from the PESA study to later analyze RNA-seq and proteomics from the study. 4C-seq study was done to study the folding and chromatin interactions of the 46/1 haplotype of JAK2. Finally, we performed qPCRs to measure the expression of candidate genes in cells sorted by gradient and flow cytometry.

Results:

the presence of mutations, especially those with clinical relevance, was associated with the diagnosis of myeloid neoplasms. In addition, mutations in tyrosine kinase genes, epigenetic modifiers and splicing factors were associated with myeloid pathology. In multivariate analysis only the presence of mutations with clinical relevance, was associated with myeloid neoplasm. MPN patients with CBL mutations showed lower survival. Detection of mutations by NGS, detection of mutations with clinical relevance, presen-

ce of mutations in tyrosine kinase genes, epigenetic modifiers and DAT genes (DNMT3A, ASXL1 and TET2) were associated with progression in MPN patients. The individual genes associated with progression were ASXL1, CALR and TET2. The number of mutations was associated with progression in multivariate analysis. Patients with mutations in epigenetic modifiers, DAT mutations or a greater number of mutations presented worse progression free survival. When we focused in thrombosis, mutations in DAT genes, specifically TET2 and DNMT3A, were associated with thrombosis in the entire cohort. TET2 and DNMT3 association persisted in multivariate analysis and a KNMT2A association appeared. In the MPN cohort thrombosis was only associated with DNMT3A mutations. We identified 17 non-canonical mutations in JAK2, MPL and CALR. We identified and characterized the compound S505C and W515R cis mutation of MPL and observed that S505C cooperates with W515R/L increasing the transcriptional activity of STAT5 and cell proliferation of carrier cells. We identified a family with familial thrombocytosis and characterized the JAK2 R6836 as the variant with constitutive activity that causes the disease. No causal clear candidate genes were found as the cause of familial MPN in the two families studied by WES. Regarding the JAK2 46/1 haplotype, no relevant differences between haplotypes were found neither in clinical variables nor analytical or in the blood RNA-seq and proteomic studies. However, we identified differential interactions through the study of chromatin structure. Those interactions entail a change of the expression in lymphocytes of JAK2, PD-L2, with more relevance, of PD-L1.

Conclusions:

sequencing of a panel of genes implicated in myeloid pathology by NGS is useful for the diagnosis and prognostic stratification of MPN patients. Non-driver mutations in-

fluence mortality, progression and thrombosis in MPN patients. Double cis mutation in MPL are able to modify disease's biology. Germinal R683G JAK2 mutation causes familial thrombocytosis. Inheritance of familial MPN is complex and large pedigrees are needed in order to identify their causal variants. The study of the three-dimensional structure of the genome helped us to identify PD-L1 overexpression as a putative mechanism through which the 46/1 haplotype of JAK2 mediates its effect.

INTRODUCCIÓN

I. LAS NEOPLASIAS MIELOPROLIFERATIVAS

Según la Clasificación de los Tumores de Tejidos Hematopoyéticos y Linfoides de la Organización Mundial de la Salud (OMS) podemos definir las Neoplasias Mieloproliferativas (NMP) como trastornos clonales de la célula madre hematopoyética caracterizados por la proliferación de una o más líneas mieloides (p.e. granulocítica, eritroide, megacariocítica)^{1,2}. Presentan una incidencia de 6 casos anuales por 100.000 habitantes y aunque su edad de presentación más frecuente está entre la quinta y la séptima década de la vida pueden presentarse a cualquier edad^{1,3,4}.

A su debut, estas entidades están caracterizadas por una médula ósea hipercelular con una maduración efectiva de los progenitores hematopoyéticos y un incremento del número de granulocitos, glóbulos rojos y/o plaquetas en sangre periférica. La esplenomegalia y hepatomegalia son comunes tanto por el secuestro del exceso de células sanguíneas como por la proliferación de células hematopoyéticas anormales en los mismos. Posteriormente, y tras un curso crónico que puede durar años, la enfermedad progresa hasta llegar a un fallo medular secundario a mielofibrosis, hematopoyesis ineficaz o transformación a leucemia aguda¹.

Tabla 1.

Clasificación de las Neoplasias Mieloproliferativas según la OMS 2016

NEOPLASIAS MIELOPROLIFERATIVAS (NMP)
Leucemia Mieloide Crónica (LMC) BCR-ABL1+
Leucemia Neutrófila Crónica (LNC)
Policitemia Vera (PV)
Mielofibrosis Primaria (MFP)
- MFP prefibrótica/estadio inicial
- MFP en fase fibrótica
Trombocitemia Esencial (TE)
Leucemia Eosinófila Crónica (sin otra especificación)
Neoplasia Mieloproliferativa inclasificable

Aunque la Clasificación de las Neoplasias Mieloproliferativas según la OMS está resumida en la Tabla 1, podemos clasificar las NMP en Leucemia Mieloide Crónica (LMC), Neoplasias Mieloproliferativas Filadelfia Negativas Clásicas y Neoplasias Mieloproliferativas Filadelfia Negativas Poco Frecuentes aunando sus características epidemiológicas, clínicas y fisiopatología molecular⁵.

La característica fundamental de la LMC es la presencia del Cromosoma Filadelfia, una $t(9;22)$ que da lugar a la proteína de fusión BCR-ABL1^{2,6,7}. La gran actividad tirosina cinasa de esta proteína conlleva la activación constitutiva de diversas rutas de señalización que aumentan la proliferación, reducen la apoptosis y producen inestabilidad ge-

nética⁸. Se caracteriza por una fase crónica poco sintomática con leucocitosis y esplenomegalia seguida de una fase acelerada que lleva a una crisis blástica (leucemia aguda)⁶⁻⁸. El desarrollo de inhibidores de tirosin cinasa dirigidos frente a BCR-ABL ha cambiado drásticamente el pronóstico de estos pacientes^{6,7}.

Por otro lado nos encontramos con las Neoplasias Mieloproliferativas Filadelfia Negativas Clásicas que incluyen las NMP sin presencia de la traslocación t(9;22) más frecuentes, la Policitemia Vera (PV), la Trombocitemia Esencial (TE) y la Mielofibrosis Primaria (MFP)^{1-3,5,9,10}. Éstas, como veremos a continuación, comparten ciertas características clínicas, analíticas y moleculares. Sobre éstas versa esta Tesis Doctoral y es a las que nos referiremos como NMP salvo que se especifique lo contrario.

Por último, nos encontramos con las Neoplasias Mieloproliferativas Filadelfia Negativas Poco Frecuentes. Estas son entidades de muy baja incidencia y difícil diagnóstico caracterizadas por la proliferación de determinados tipos celulares. Son la Leucemia Neutrófila Crónica, la Leucemia Eosinófila Crónica (sin otra especificación) y las Neoplasias Mieloproliferativas No Clasificables^{1,2,5}.

2. LAS NEOPLASIAS MIELOPROLIFERATIVAS FILADELFIA NEGATIVAS CLÁSICAS

2.1 Policitemia Vera

La Policitemia Vera o Policitemia Rubra Vera es una NMP caracterizada por un incremento en la producción de glóbulos rojos independiente de los mecanismos que regulan normalmente la eritropoyesis. Tiene una incidencia de 0.4-2.8 casos por 100.000 habitantes y un ligero predominio en hombres con una mediana de edad de 65 años^{3,11,12}. Los criterios diagnósticos de esta entidad se basan en datos clínicos, de laboratorio e histológicos de médula ósea y están resumidos en la Tabla 2^{1,2}.

Tabla 2.

Criterios de la OMS 2016 para el diagnóstico de la Policitemia Vera

Se requiere la presencia de los 3 criterios mayores o la presencia de los dos primeros criterios mayores junto el criterio menor. *Definida como el 25% del límite superior de la normalidad. **La biopsia de médula ósea puede no ser necesaria en caso de niveles de hemoglobina >18,5 g/dl en hombres (hematocrito 55,5 %) o >16,5 g/dL en mujeres (hematocrito 49,5%) en caso de estar presentes el criterio 3 y el criterio menor.

POLICITEMIA VERA
<i>Criterios Mayores</i>
1. Hemoglobina >16,5 g/dL en hombres, >16,0 g/dL en mujeres o Hematocrito >49% en hombres/ Hematocrito >48% en mujeres o masa eritrocitaria aumentada*.
2. Biopsia de médula ósea que demuestre una hipercelularidad trilineal (panmielosis), para la edad del paciente, con proliferación prominente eritroide, granulocítica y megacariocítica, con megacariocitos maduros de aspecto pleomórfico**.
3. Presencia de la mutación JAK2 V617F u otra mutación activadora de JAK2, como las del exón 12.
<i>Criterios menores</i>
1. Eritropoyetina sérica por debajo del valor de referencia normal

La alteración genética más relevante en la etiopatogenia de la enfermedad son las mutaciones en el gen JAK2, estando presente la V617F en un 95% de los pacientes y las mutaciones en el exón 12 en otro 3% de los casos^{4,13,14}. Todas estas mutaciones conllevan una ganancia de función que, como veremos más adelante, resulta en un incremento de la proliferación de progenitores hematopoyéticos eritroides, granulocíticos y megacariocíticos: se trata de una panmielosis^{1,4,14}.

Esta proliferación hace que los pacientes de PV presenten un incremento de la concentración de hemoglobina mientras que la médula ósea presenta hipercelularidad con un

incremento marcado de los progenitores eritroides y un aumento del número de megacariocitos, que presentan pleomorfismo y forman grupos laxos¹.

La historia natural de la PV consta de dos fases, una Fase Policitémica, caracterizada por una elevación de los niveles de hemoglobina, el hematocrito y la masa eritroide y una Fase Gastada o de Mielofibrosis Post-Policitemia Vera (MF-PostPV) con citopenias, fibrosis medular, hematopoyesis extramedular (fundamentalmente en bazo e hígado) e hiperesplenismo¹. Una pequeña proporción de pacientes puede progresar a mielodisplasia o leucemia aguda^{1,12,15}. Sin embargo, las principales complicaciones y manifestaciones clínicas de estos pacientes se deben al incremento de la masa eritrocitaria que acarrea un incremento de la viscosidad de la sangre del paciente¹. Estos pacientes presentan un incremento del riesgo de padecer hemorragias y trombosis, incluyendo localizaciones atípicas como el síndrome de Budd-Chiari así como síntomas derivados de la hiperviscosidad (cefalea, mareos, eritromelalgia, etc.)^{1,12,15-17}. En un estudio observacional publicado recientemente¹² con seguimiento a largo plazo de 1545 pacientes de PV un 12% de los pacientes presentaron trombosis arterial, un 9% de trombosis venosa y un 4.2% hemorragias mayores mientras que solo un 9% progresaron a MF-PostPV y un 3% a Leucemia Mieloide aguda (LMA).

Con todo, la PV se trata de una enfermedad crónica con una mediana de supervivencia de más de 10 años (14 años en el estudio comentado anteriormente) siendo la principal causa de mortalidad las complicaciones trombóticas y la aparición de segundas neoplasias^{1,4,9,12,13,15,17-19}. Por tanto, los objetivos del tratamiento en estos enfermos buscan reducir las complicaciones trombóticas y hemorrágicas y controlar los síntomas derivados de la enfermedad así como minimizar la progresión de la enfermedad a MFPost-PV^{5,9,13}. Para ello se han utilizado clásicamente las flebotomías para reducir rápidamente la masa

eritrocitaria, la antiagregación para prevenir la trombosis y la hidroxycarbamida y el interferón alfa pegilado como agentes citoreductores a los que se ha añadido recientemente el ruxolitinib, un inhibidor de JAK^{5,9,13}.

2.2 Trombocitemia Esencial

La Trombocitemia Esencial o Trombocitemia Idiopática es una NMP que afecta primariamente a la línea megacariocítica. Tiene una incidencia de unos 0.38-1.7 casos por cada 100.000 habitantes³. La mediana de edad al diagnóstico es de unos 68 años, con un ligero predominio en mujeres^{1,3,11,20}. Esta descrito también un pico de incidencia a los 30 años^{1,11,20}. Dado que no se conoce un marcador biológico ni genético específico de la TE, para su diagnóstico deben excluirse otras NMP así como causas reactivas de trombocitosis (infecciones, inflamación, etc)^{1,2,9,13}. Los criterios diagnósticos de esta entidad están resumidos en la Tabla 3^{1,2}.

Tabla 3.

Criterios de la OMS 2016 para el Diagnóstico de la Trombocitemia Esencial

Se requiere la presencia de los 4 criterios mayores o de los 3 primeros mayores y el criterio menor.

TROMBOCITEMIA ESENCIAL	
<i>Criterios Mayores</i>	
1. Trombocitosis persistente $\geq 450 \times 10^9/L$	
2. Biopsia medular con predominio de megacariocitos maduros y de gran tamaño con núcleo hiperlobulado, sin incremento significativo o desviación a la izquierda de la granulopoyesis o de la eritropoyesis y muy infrecuentemente incremento de la reticulina (MF1).	
3. No evidencia, según criterios diagnósticos de la OMS, de policitemia vera (PV), mielofibrosis primaria (MFP), leucemia mieloide crónica (LMC), síndrome mielodisplásico (SMD) u otra neoplasia mieloide.	
4. Demostración de la mutación JAK2 V617F, CALR o MPL.	
<i>Criterios menores</i>	
1. Presencia de un marcador clonal o ausencia de evidencia de trombocitosis reactiva.	

Al igual que la PV y la MFP, las alteraciones moleculares más importantes en la etiopatogenia de la enfermedad afectan a la ruta de señalización de citoquinas, estando presentes la mutación V617F de JAK2 en aproximadamente un 50-60% de los casos, mutaciones tipo inserción o delección en el gen CALR en un 30% y mutaciones W515K/L en MPL en un 3% de los casos^{1,4,13,14}. Estas mutaciones activan rutas de señalización que causan una trombocitosis en sangre periférica y un incremento del número de megacariocitos en la médula ósea además de ser responsables en última instancia de la clínica del paciente^{1,14}. Aquellos casos de TE que no presentan ninguna de las llamadas mutaciones canónicas se denominan Trombocitemias Esenciales Triple Negativas (TE-TN, aproximadamente un 10% de los casos)^{4,14}.

Respecto a sus características citológicas e histológicas, se trata de una entidad poco expresiva en comparación con otras neoplasias mieloides. En sangre periférica sólo destaca una trombocitosis con anisotrombia (plaquetas de distinto tamaño y forma) sin observarse normalmente alteraciones en la cifra o morfología de leucocitos o glóbulos rojos^{1,5}. En cuanto a la médula ósea, ésta es habitualmente normocelular (en ocasiones hiper celular) con una marcada proliferación de los megacariocitos, que son grandes, con un citoplasma amplio y un núcleo hiperlobulado (en asta de ciervo)¹. Suelen estar dispersos o formando grupos laxos y se puede observar emperipolesis. La presencia de fibrosis es excepcional (y siempre menor de un grado 1) y no hay displasia¹.

En cuanto a su clínica y pronóstico, la TE suele tener una presentación asintomática siendo un diagnóstico incidental en más de la mitad de los casos. El resto pueden tener manifestaciones hemorrágicas o trombóticas^{16,21}. La esplenomegalia está presente en torno a un 20% de los casos^{1,17,22}. En general la esperanza de vida es bastante similar a la de la población general con medianas de supervivencia de hasta 20 años^{4,17,19,22}. Un 10% de los casos progresan a mielofibrosis mientras que menos de un 5% progresan a policitemia vera o presentan transformación blástica¹⁷.

Respecto a su tratamiento, de manera similar a la PV, va dirigido a reducir las complicaciones trombóticas y hemorrágicas así como a prevenir su progresión^{5,9,13}. Se utilizan agentes como agentes citorreductores, la hidroxycarbamida, el busulfán, el interferon alfa pegilado y, como agente que inhibe la maduración plaquetaria, el anagrelide^{5,9,13,23}.

2.3 Mielofibrosis Primaria

La Mielofibrosis Primaria, también llamada Metaplasia Mieloide Agnogénica o Mielofibrosis Idiopática, es la más infrecuente (0.1-1 casos por 100.000 habitantes) de las NMP Filadelfia Negativas Clásicas siendo su edad mediana al diagnóstico de 70 años^{1,3}. Como la PV y la TE, se caracteriza por un aumento de proliferación en la médula ósea, destacando la de megacariocitos anormales y serie granulocítica¹. Sin embargo, el rasgo distintivo de esta entidad es el depósito de tejido fibroso en la médula ósea que acarrea una insuficiencia medular progresiva con hematopoyesis extramedular y esplenomegalia¹.

En cuanto a sus alteraciones moleculares más relevantes, sus mutaciones driver son las mismas que las descritas en TE (60% JAK2 V617F, 30% CALR, 8% MPL y 12% Triples Negativas) aunque, como veremos en la siguiente sección, la MFP presenta mayor número de alteraciones citogenéticas y moleculares^{1,4,14,24}.

Su historia natural presenta una evolución desde una fase Inicial o Prefibrótica, con una médula hipercelular y sin apenas fibrosis hasta una fase Fibrótica que puede venir acompañada incluso de osteoesclerosis¹. Al igual que el resto de NMP, puede presentar transformación a LMA^{1,17}. Los criterios diagnósticos de ambas entidades quedan resumidos en las Tablas 4 y 5^{1,2}.

La MFP Prefibrótica es fácilmente confundible con la TE. Teniendo en cuenta que entre un 30 y un 50% de las MFP son diagnosticadas en esta fase y dadas las importantes diferencias en cuanto a pronóstico y tratamiento, es muy importante conocer sus características histológicas^{22,25}. La fibrosis es más frecuente en la MFP Prefibrótica que

en la TE aunque siempre con un grado 0-1^{1,25}. También la celularidad está aumentada así como la ratio mieloide-eritroide, al contrario que en la TE que presenta celularidad normal y una ratio normal^{1,25}. Por último, los megacariocitos en la MFP Prefibrótica forman grupos densos y tienen un tamaño menor y más variable que en la TE, siendo sus núcleos hipolobulados o con núcleo en globo^{1,25}. Respecto a la morfología de la MFP en fase Fibrótica, ésta es mucho más marcada, con fibrosis reticulínica y/o colágena de grado 2-3 y una celularidad que, aunque puede estar aumentada, suele estar disminuida además de presentar megacariocitos dismórficos que se juntan en grupos grandes cerca de los sinusoides vasculares, los cuales se encuentran marcadamente aumentados¹. También puede encontrarse un aumento de células blásticas (<10% de mieloblastos) y, en los casos avanzados, osteoesclerosis. La sangre periférica no suele ser muy expresiva al inicio de la enfermedad, presentando dacriocitos y un cuadro leucoeritroblástico conforme avanza¹.

Tabla 4.

Criterios de la OMS 2016 para el Diagnóstico de la Mielofibrosis Primaria Prefibrótica/en Estadio Inicial

Se requiere la presencia de los 3 criterios mayores y al menos 1 de los menores. *En ausencia de cualquiera de las tres mutaciones clonales mayores, la búsqueda de las mutaciones acompañantes más frecuentes (p.ej., ASXL1, EZH2, TET2, IDH1/IDH2, SRSF2, SF3B1) ayuda a determinar la naturaleza clonal de la enfermedad. **Fibrosis reticulínica secundaria a infección, enfermedad autoinmune u otro trastorno inflamatorio crónico, tricoleucemia u otra neoplasia linfóide, cáncer metastático o mielopatía tóxica (crónica).

mieLOFIBROSIS PRIMARIA PREFIBRÓTICA/EN ESTADIO INICIAL

Criterios Mayores

1. Biopsia medular con proliferación de megacariocitos atípicos, sin fibrosis reticulínica > grado 1, con incremento en la celularidad medular ajustada según la edad, proliferación granulocítica y con disminución de la eritropoyesis en muchos casos.
2. No cumplir los criterios de la OMS para LMC BCR-ABL1+, PV, TE, síndromes mielodisplásicos u otras neoplasias mieloides.
3. Demostración de mutación de JAK2, CALR o MPL o, en ausencia de estas mutaciones, presencia de otro marcador clonal* o ausencia de leve fibrosis reticulínica medular reactiva**

Criterios menores

1. Anemia no atribuible a comorbilidad.
2. Leucocitosis $\geq 11 \times 10^9/L$.
3. Esplenomegalia palpable.
4. Aumento del nivel de lactato deshidrogenasa (LDH) sérica por encima del valor superior normal de referencia para cada centro.

En cuanto a la presentación clínica, aunque parte de los pacientes puede diagnosticarse incidentalmente (por ejemplo el hallazgo de esplenomegalia, presente en hasta un 90% de los pacientes), más de la mitad de los pacientes presenta una sintomatología marcada

al diagnóstico^{4,9,17,24}. Ésta se caracteriza por síntomas constitucionales como astenia, disnea, fiebre, pérdida de peso o sudoración profusa.

Si nos centramos en su pronóstico, la MFP tiene un pronóstico muy variable^{9,17,26–31}. Los pacientes de riesgo bajo tienen una mediana de supervivencia de cerca de 10 años mientras que aquellos de alto riesgo tienen una expectativa de vida de meses. La MFP solo es curable mediante el trasplante alogénico de progenitores hematopoyéticos^{26–31}. Para aquellos pacientes no candidatos a trasplante pueden utilizarse inhibidores de JAK2 así como otros fármacos como el danazol o agentes eritropoyéticos^{5,9,32}.

Tabla 5.

Criterios de la OMS 2016 para el Diagnóstico de la Mielofibrosis Primaria en Fase Fibrótica

Se requiere la presencia de los 3 criterios mayores y al menos 1 de los menores confirmado en dos determinaciones consecutivas. *En ausencia de cualquiera de las tres mutaciones clonales mayores, la búsqueda de las mutaciones acompañantes más frecuentes (p.ej., ASXL1, EZH2, TET2, IDH1/IDH2, SRSF2, SF3B1) ayuda a determinar la naturaleza clonal de la enfermedad. **Fibrosis reticulínica secundaria a infección, enfermedad autoinmune u otro trastorno inflamatorio crónico, tricoleucemia u otra neoplasia linfoide, cáncer metastático o mielopatía tóxica (crónica).

MIELOFIBROSIS PRIMARIA EN FASE FIBRÓTICA

Criterios Mayores

1. Biopsia medular con proliferación de megacariocitos atípicos, acompañada de fibrosis reticulínica y/o colágena grados 2 ó 3
2. No cumplir criterios de la OMS para TE, PV, LMC BCR-ABL1+, síndromes mielodisplásicos u otras neoplasias mieloides.
3. Demostración de mutación de JAK2, CALR o MPL o, en ausencia de estas mutaciones, presencia de otro marcador clonal* o ausencia de fibrosis medular reactiva**

Criterios menores

1. Anemia no atribuible a comorbilidad.
2. Leucocitosis $\geq 11 \times 10^9/L$.
3. Esplenomegalia palpable.
4. Aumento del nivel de lactato deshidrogenasa (LDH) sérica por encima del valor superior normal de referencia para cada centro.
5. Síndrome leucoeritroblástico en sangre periférica

3. FISIOPATOLOGÍA MOLECULAR DE LAS NEOPLASIAS MIELOPROLIFERATIVAS

En la etiopatogenia de las NMP están implicados diversos factores como el envejecimiento, la predisposición genética o la inflamación^{14,33,34}. Sin embargo, si algo caracteriza estas enfermedades es el profundo conocimiento de las mutaciones somáticas que llevan a la transformación de la célula madre hematopoyética y la aparición de la enfermedad¹⁴. El desarrollo de las técnicas citogenéticas y de secuenciación ha permitido el descubrimiento de numerosas mutaciones recurrentes en todas las neoplasias mieloides¹⁴. Sin embargo, sólo unas pocas se asocian sólo a una entidad o grupo de entidades¹⁴. Por tanto, dividiré las mutaciones presentes en las NMP en Mutaciones *driver* (conductoras) de NMP y Otras Mutaciones presentes en NMP.

3.1 Mutaciones *driver* de NMP

Podemos definir las mutaciones driver o conductoras como aquellas que son capaces de mediar la transformación neoplásica de una célula, en el caso de las NMP, la célula madre hematopoyética³⁵. En el caso de las NMP, estas mutaciones alteran la ruta de señalización de receptores de citoquinas siendo los genes afectados, por orden de frecuencia, JAK2, CALR y MPL^{14,35}. Además, aunque se pueden encontrar en otras neoplasias hematológicas, están muy restringidas a las NMP formando parte como ya hemos visto de sus criterios diagnósticos^{1,2,14}.

3.1.1 JAK2

La Cinasa Janus 2 (JAK2) pertenece a la familia de cinasas JAK¹⁴. Esta familia puede considerarse como la parte catalítica de los receptores de citoquinas hematopoyéticas ya que las proteínas JAK se encuentran constitutivamente unidas a ellos. El receptor de eritropoyetina (EPOR), el de trombopoyetina (MPL o TPOR) y el receptor del factor estimulante de crecimiento de colonias granulocíticas (GCSFR) funcionan en parte a través de JAK2¹⁴. De una manera sencilla, la unión de la citoquina correspondiente cambia la conformación de los receptores y estos activan JAK2 mediante transfosforilación. JAK2 activado fosforila y activa a su vez moléculas de señalización como los factores de transcripción STAT. Una vez activados, los factores STAT se dimerizan y translocan al núcleo donde modifican la transcripción de numerosos genes y activan rutas de proliferación y supervivencia¹⁴.

En 2005 se describió la mutación V617F en JAK2 en un 70% de las NMP: un 95% de las PV y entre un 50 y un 60% de las TE y MFP³⁶⁻³⁸. Esta mutación se debe a un cambio de G por T en el nucleótido 1849 del exón 14 de JAK2 lo que conlleva un cambio de valina por fenilalanina en el dominio pseudocinasa de JAK2, el cual se encarga de inhibir el dominio cinasa de JAK2¹⁴. Un par de años después de la descripción de la mutación V617F se descubrió que mutaciones en el exón 12 de JAK2 están presentes en la práctica totalidad de PV V617F negativas siendo excepcionales en TE o MFP^{39,40}. Estas mutaciones suelen ser inserciones o deleciones sin pérdida del marco de lectura en torno a la Lisina 539^{39,40}. Aunque el mecanismo de acción exacto de estas mutaciones no se conoce, sí se sabe que acarrearán una activación constitutiva de los STATs y otras moléculas como MAPK y la fosfatidilinositol 3 cinasa (PI3K)-AKT⁴¹. Esto hace que se produzca una proliferación celular independiente de citoquinas que conlleva la transformación de la célula madre hematopoyética^{14,41,42}.

3.1.2 CALR

La calreticulina, al contrario que JAK2, no es una molécula de señalización sino una chaperona habitualmente situada en el retículo endoplásmico¹⁴. En 2013 se descubrió que mutaciones *frameshift* (con cambio de marco de lectura) en esta proteína estaban presentes en un 50-60% de las TE y hasta un 75% de las MFP JAK2 negativas. Las dos mutaciones más frecuentes son la tipo 1 que consiste en una delección de 52 pares de bases (o.L367fs*46) y la tipo 2 consistente en una inserción de 5 pares de bases (p.K-385fs*47)¹⁴. Estas delecciones e inserciones afectan al exón 9 de CALR que incluye el motivo KDEL responsable de su anclaje al retículo endoplásmico y además aportan una nueva secuencia a la proteína con una mayor cantidad de cargas positivas. Esto hace que CALR se una a MPL (TPOR) en el retículo endoplásmico, facilitando su dimerización y activación además de su tráfico a la membrana citoplasmática donde MPL activado constitutivamente activa JAK2 promoviéndose la proliferación y producción de plaquetas^{45,46}.

3.1.3 MPL

Las mutaciones en el gen MPL (virus de leucemia mieloproliferativa), que es el gen que codifica el receptor de la trombopoyetina (TPOR), están presentes en un 2-3% de los casos de TE y en aproximadamente un 5% de los casos de MFP^{14,47}. Las más frecuentes se encuentran en el codón 515, especialmente las mutaciones W515L y W515K, que se encuentra entre el dominio transmembrana y el citosólico^{14,47-49}. Se han descrito mutaciones en otros codones, destacando la S505N de localización en transmembrana⁵⁰. Las mutaciones en el codón 515 permiten la activación del receptor independiente de trombopoyetina y la mutación S505N estabiliza el dímero de TPOR^{14,51,52}. En cualquier caso, todas ellas activan de forma constitutiva la ruta de señalización que incrementa la proliferación de megacariocitos¹⁴.

3.2 Otras mutaciones presentes en NMP

Las mutaciones en los llamados genes *driver* no explican completamente la biología y pronóstico de las NMP¹⁴. El desarrollo de las técnicas de secuenciación de nueva generación (NGS) ha permitido la identificación de numerosos genes mutados no sólo en NMP sino más frecuentemente en otras neoplasias mieloides como los síndromes mielodisplásicos (SMD) y las leucemias mieloides agudas. Esto pone de manifiesto el *continuum* que forman las distintas neoplasias mieloides estando la mayoría de estas mutaciones implicadas en la progresión y cambios de fenotipo de las NMP¹⁴.

Las mutaciones identificadas incluyen reguladores de la metilación del DNA (TET2, DNMT3A, IDH1/2), modificadores de histonas (miembros de PRC1 y 2, IDH1/2), factores de transcripción (TP53, CUX1, IKZF1, FOXP1, ETV6, RUNX1), proteínas de señalización (NF1, NRAS, KRAS, LNK, CBL, FLT3, LNK) y factores de *splicing* (SF3B1, SRSF2, U2AF1, ZRSR2)^{14,53–58}.

4. RIESGO MOLECULAR DE LAS NEOPLASIAS MIELOPROLIFERATIVAS

4.1 Riesgo molecular en Policitemia Vera

El antecedente de trombosis, el incremento de la edad, la leucocitosis y el cariotipo anormal predicen peor supervivencia global en la PV^{4,12}. De estos, además, los tres primeros disminuyen la supervivencia libre de transformación a leucemia^{4,12}. Sin embargo, su perfil molecular también afecta a la biología y pronóstico de la enfermedad^{4,13,59}.

Las PV con mutaciones en el exón 12 se caracterizan por presentar una eritrocitosis aislada con mayor cifra de hemoglobina que las JAK2 V617F positivas mientras que estas últimas presentan también trombocitosis y leucocitosis^{4,14,40}. En cualquier caso, tanto las PV JAK2 V617F positivas y aquellas con mutaciones en el exón 12 presentan la misma tasa de complicaciones y supervivencia^{4,39,40}.

Por último, aunque hay muy poca literatura al respecto, en los últimos años la aparición de las técnicas NGS ha permitido estudiar el papel pronóstico de las mutaciones ‘no driver’^{54,58,60,61}. El estudio de Tefferi et al.⁵⁴, con secuenciación dirigida de 27 genes en 133 pacientes con PV es probablemente el más completo a día de hoy. El gen más frecuentemente mutado fue TET2 (un 20%) seguido de ASXL1 y SH2B3 en torno a un

10% de los casos⁵⁴. Aunque la demetilasa TET2 y el regulador de JAK2 SH2B3 (LNK) están claramente implicados en la etiopatogenia de la enfermedad (TET2 aporta ventaja clonal^{62,63} y LNK se ha asociado a NMP familiares⁶⁴), éstos no afectaron al pronóstico de la misma. En cambio, los reguladores epigenéticos IDH2 y ASXL1 y el factor de *splicing* SRSF2 sí se asociaron a menor supervivencia de los pacientes con PV (los dos últimos también en análisis multivariante)⁵⁴. En cuanto a la supervivencia libre de transformación a leucemia, RUNX1, IDH2 y SRSF2 aportan un peor pronóstico y RUNX1 y SRSF2 se asociaron también a una mayor progresión a mielofibrosis aunque el factor de transcripción RUNX1 perdió significación tras ajustar por otras variables⁵⁴.

4.2 Riesgo molecular en Trombocitemia Esencial

De una forma similar a la PV, el antecedente de trombosis, la edad avanzada y la leucocitosis empeoran la supervivencia de los pacientes con TE^{4,65}. Es lo que se conoce como score IPSET⁶⁵. En cuanto al riesgo trombótico, al igual que en PV, la edad y la historia personal de trombosis incrementan su riesgo⁶⁶. En el caso de la TE también los factores de riesgo vascular y la presencia de la mutación JAK2 V617F están claramente implicados en el riesgo de trombosis constituyendo estos cuatro factores el score de riesgo trombótico IPSET-trombosis⁶⁶. El papel de JAK2 en la trombosis es tan relevante que su sola presencia indica la antiagregación^{5,9}. Respecto a las otras mutaciones driver CALR está asociada a un mayor riesgo de progresión a mielofibrosis y MPL y CALR a una mayor cifra de plaquetas^{44,47,67-69}. Las TE triple negativas (aquellas que no presentan mutaciones en ningún gen *driver*) tienen una presentación indolente sin apenas eventos trombóticos o progresión por lo que presentan un buen pronóstico⁴.

Respecto a mutaciones no *driver*, en el estudio de Tefferi et al.⁵⁴ con 183 pacientes IDH2, SH2B3 y EZH2 asociaron una peor supervivencia global aunque EZH2 perdió significación tras análisis multivariante. Si nos centramos en la transformación leucémica y progresión a mielofibrosis, las mutaciones en TP53 y EZH2 aumentaron el riesgo de la primera y las mutaciones en SF3B1 y U2AF1 a la segunda aunque SRSF2 e IDH2 podrían jugar también un papel en la progresión a leucemia⁵⁴. Sin papel pronóstico, al igual que en PV, TET2 y ASXL1 son los genes no driver más mutados en TE⁵⁴.

4.3 Riesgo molecular en Mielofibrosis Primaria

Los *scores* pronósticos clásicos de mielofibrosis hasta la llegada del DIPSS-plus (*Dynamic International Prognostic Score System-plus*) se han basado en factores clínicos^{28,30}. El IPSS (*International Prognostic Score System*) y el DIPSS se basan en la edad, la cifra de hemoglobina y leucocitos, la presencia de blastos en sangre periférica y los síntomas constitucionales^{28,30}. El DIPSS-plus incluye la dependencia transfusional, la cifra de plaquetas y por primera vez, información citogenética, considerándose cariotipo desfavorable aquel que presenta cariotipo complejo o alguna de la siguientes: +8, -7/7q-, i(17q), inv(3), -5/5q-, 12p- o un reordenamiento 11q23²⁹.

Al igual que en TE, las distintas mutaciones *driver* influyen en la biología y pronóstico de la enfermedad, destacando el mal pronóstico que presentan aquellos casos de MFP triples negativos, asociados a una mayor incidencia de transformación leucémica^{4,14,55}. Las mutaciones tipo 1 en CALR son las que aportan un mejor pronóstico teniendo menos anemia, trombocitopenia y leucocitosis además de menor riesgo de trombosis que las mielofibrosis JAK2 V617F positivas^{68,70-73}.

Si nos centramos en las mutaciones no *driver*, éstas tienen una gran relevancia en el pronóstico de la enfermedad^{4,14}. Al contrario que en PV o en TE donde en torno el 50% de los pacientes no presentan mutaciones adicionales y los que las presentan suelen tener solo una mutación acompañante, las MFP tienen mutaciones adicionales en más de un 80% de los casos presentando cerca de un 50% dos o más mutaciones no *driver*^{14,53}. En cuanto a su influencia pronóstica, ASXL1, EZH2, SRSF2 e IDH1 y 2 son consideradas mutaciones de alto riesgo y ya se incluyen en algunos índices pronósticos como el MIP SS70^{9,26,27,31,32,55,56,74-77}. Otros genes cuyas mutaciones parecen tener influencia pronóstica deletérea son CBL, KIT, RUNX1, CEBPA y SH2B3⁵³.

5. HERENCIA DE LAS NEOPLASIAS MIELOPROLIFERATIVAS

La inmensa mayoría de las NMP son casos esporádicos en los que la adquisición de una mutación por parte de la célula madre hematopoyética conlleva una expansión clonal de precursores mieloides^{34,78,79}. A pesar de ello, diversas evidencias apoyan el papel de la herencia genética en la patogenia de las NMP^{34,78,79}.

Los familiares de pacientes con NMP tienen entre 5 y 7 veces más riesgo de padecer una NMP que la población general y se ha descrito que hasta un 7.6% de los casos esporádicos de NMP son en realidad familiares^{80,81}. Además, se han reportado pacientes con NMP biclonales lo cual dada la baja probabilidad de que ocurran dos eventos clonales independientes en el mismo paciente indica que debe haber una predisposición genética⁸²⁻⁸⁴. Por último y como se ha comentado previamente, las NMP presentan distinto fenotipo (TE, PV, MFP) a pesar de compartir la misma mutación driver (p.e. JAK2) lo que destaca el papel del fondo genético en la patogenia de esta enfermedad³⁴.

De una manera académica, cuando hablamos de predisposición genética a padecer NMP podemos dividirla en: a) Mutaciones germinales, que son variantes raras que ocasionan Neoplasias Mieloproliferativas familiares con una penetrancia relativamente elevada y una herencia tipo mendeliano. b) Polimorfismos predisponentes que son variantes co-

munes que sólo predisponen a padecer NMP y tienen por tanto una penetrancia baja. c) Eritrocitosis y Trombocitosis familiares (NMP-*like*) que son trastornos no clonales que a menudo pueden confundirse con NMP y están causados por mutaciones con herencia mendeliana dominante o recesiva⁷⁸.

5.1 Neoplasias Mieloproliferativas Familiares

Se han descrito numerosas familias con dos o más miembros afectados de NMP, calculándose que más de un 7% de los casos de NMP pueden ser familiares⁸¹. Estos pacientes se caracterizan por la adquisición de mutaciones somáticas en los genes conductores de NMP con unas características clínicas, complicaciones y pronóstico similares a los de los casos esporádicos, habiéndose descrito anticipación en algunos casos^{34,78,81}. Además, el tipo de mutación y de NMP puede ser distinto dentro del mismo pedigrí⁸¹. Por tanto, las mutaciones germinales presentes en estos pacientes predispondrían bien a la adquisición de las mutaciones bien a la progresión de la enfermedad una vez la mutación conductora es adquirida y esta predisposición sería heredada de una manera autosómica dominante con una expresión y penetrancia variables^{34,78}.

El avance en técnicas de citogenética y biología molecular ha permitido que en los últimos años se hayan descrito las primeras mutaciones germinales causantes de NMP familiares^{64,85-87}.

La primera de ellas, descrita en varias familias de las Antillas Francesas con predisposición a las neoplasias mieloides (destacando TE con progresión a LMA secundaria), consiste en una duplicación de unas 700kb en el cromosoma 14 que incluye los genes ATG2B y GSKIP⁸⁵. La sobreexpresión de estos genes potencia la diferenciación de

los progenitores hematopoyéticos incrementando su sensibilidad a la trombopoyetina aumentando la probabilidad de desarrollar la enfermedad una vez adquiridas las mutaciones conductoras⁸⁵.

Otros dos genes con mutaciones germinales han sido asociados a NMP familiares, RBBP6 y SH2B3. RBBP6 es un regulador de p53 por lo que se ha propuesto que el mecanismo de acción de sus mutaciones sea una inhibición de p53 y una disregulación del ciclo celular que ocasiona un aumento de la mutagénesis somática, aunque esto no está claramente demostrado⁸⁶. SH2B3, también conocido como LNK, es un regulador negativo de la señalización de citoquinas y se ha demostrado que la mutación E208Q produce una sobreactivación de la vía JAK-STAT en respuesta a trombopoyetina^{64,87,88}.

En cualquier caso, estas mutaciones son muy raras (menos del 10% de las NMP familiares) y no explican la mayoría de casos por lo que todavía faltan por identificar otros genes implicados en la etiopatogenia de las NMP familiares⁷⁸.

5.2 Predisposición Común a padecer Neoplasias Mieloproliferativas

Cómo se mencionará en el último apartado de esta introducción, el desarrollo de las técnicas de secuenciación ha permitido la realización de numerosos estudios para identificar y caracterizar variantes de riesgo en el genoma. Entre estas destacan los estudios globales de asociación del genoma (GWAS por sus siglas en inglés) gracias a los cuales se han identificado varios polimorfismos asociados al desarrollo de NMP en una decena de genes o regiones genómicas⁸⁹.

Estos polimorfismos son comunes y con una penetrancia baja por lo que no sirven para predecir el desarrollo de la enfermedad. Sin embargo, pueden explicar algo más del 50% del riesgo poblacional atribuible según los subgrupos de NMP^{34,79,90}.

Las variantes se encuentran en genes o regiones cercanas a genes implicados en el envejecimiento celular (TERT)^{90,91}, la regulación epigenética (TET2)⁹², la señalización mediada por citoquinas (SH2B3, GR β)^{92,93}, la reparación del DNA y la supresión de tumores (ATM, CHEK2, PINT)⁹² y el desarrollo de eritrocitos y megacariocitos (GFI1B, HBS1L-MYB y MECOM)⁹⁰. Sin embargo, la primera variante descrita, sobre la que más se ha investigado y la que parece aportar mayor riesgo es el llamado haplotipo 46/1 de JAK2, que paso a describir en profundidad^{82,94,95}.

5.2.1 El Haplotipo 46/1 de JAK2

En 2009, tres grupos describieron al mismo tiempo que un haplotipo en el cromosoma 9 se asociaba a padecer NMP JAK2 V617F positivas (OR 3-4)^{34,82,94,95}. El llamado haplotipo 46/1 o 'GGCC' (por los polimorfismos que lo definen) tiene un tamaño de cerca de 300 kb e incluye parte del gen JAK2 y los genes INSL6 e INSL4 (ambos no expresados en tejido hematopoyético), estando compuesto por varios cientos de SNPs (polimorfismos de un único nucleótido) que no cambian ninguna secuencia proteica de ningún gen^{34,82,95}. Tiene una frecuencia del alelo menos común (MAF) de en torno el 24% estando presente en hasta un 80% de los casos de NMP JAK2 V617F positivas y explica cerca del 28% de riesgo poblacional de padecer estas enfermedades (y hasta un 50% en familiares de primer grado)^{82,94,95}. Desde entonces ha habido numerosos intentos para desentrañar el mecanismo a través del cual el haplotipo incrementa el riesgo de padecer NMP, habiendo en la actualidad dos hipótesis no excluyentes apoyadas en los siguientes hallazgos^{34,96,97}:

a) Hipótesis de la Hipermutabilidad del Haplotipo 46/1: El hallazgo de que la mutación V617F se produce preferentemente en el alelo de riesgo (75% vs 25% en portadores del mismo) es lo que llevó a formular la hipótesis de que el haplotipo 46/1 es genéticamente más inestable, adquiriendo la mutación V617F a mayor velocidad que otros haplotipos⁸². Esta hipótesis está apoyada también por la observación de que el haplotipo está asociado también a las PV con mutaciones en el exón 12 aunque con menor riesgo (OR 1.8-2.1)^{98,99} además de estudios que describen casos de mutaciones biclonales en V617F⁸⁴ y en el exón 12¹⁰⁰. En cualquier caso también hay descritos casos de mutaciones de JAK2 concurrentes con mutaciones en MPL⁸³ e incluso la translocación BCR-ABL¹⁰¹ datos que apoyan una hipermutabilidad generalizada independiente del haplotipo 46/1³⁴.

b) Hipótesis del ‘Terreno fértil’: según esta hipótesis, la aparición de V617F es similar entre todos los haplotipos pero el 46/1 proporciona una ventaja evolutiva al clon mutado que facilita la progresión de la enfermedad³⁴. Se ha descrito que el haplotipo está asociado al desarrollo tanto de NMP JAK2 V617F negativas (OR 1.24) en general como a NMP con mutaciones en MPL (OR 1.44)^{98,102}. Sin embargo, estas asociaciones son más débiles y no han sido corroboradas por otros estudios¹⁰³. Tampoco se ha encontrado asociación con NMP CALR mutadas¹⁰⁴. Por otra parte, si el haplotipo 46/1 fuera funcionalmente diferente al normal podrían encontrarse diferencias entre ellos en distintas variables clínicas. Se ha descrito una mayor progresión de la carga alélica de V617F en pacientes con PV que llevan el haplotipo, lo cual podría relacionarse con una mayor facilidad del clon para expandirse¹⁰⁵. No se han conseguido validar correlaciones de valores del hemograma ni en pacientes ni en población sana³⁴. Sí cabe destacar, en base a un estudio muy sólido publicado en 2019, que la nulicigosidad del haplotipo 46/1 (es decir, no tener ninguna copia del mismo) se asocia a un peor pronóstico en pacientes con MFP^{106,107}. Parece que esto está relacionado con una disminución de los síntomas

constitucionales en estos pacientes, lo que podría deberse a una menor producción de citoquinas en los mismos ^{106,107}. Esta observación de que el haplotipo podría mediar diferencias en el sistema inmune y la inflamación se sustenta también en la asociación de algunos SNPs del haplotipo con la enfermedad inflamatoria intestinal. Por último, se ha descrito que los pacientes con LMA y el haplotipo presentan mayor frecuencia de cariotipo normal y de ser fenotípicamente mielomonocíticas además de presentar un mayor riesgo de muerte por infecciones^{97,108}.

5.3 Eritrocitosis y Trombocitosis Familiares

Por último, hay un grupo de enfermedades hereditarias y no clonales que pueden ser fácilmente confundidas con NMP familiares. Estas enfermedades, denominadas eritrocitosis o trombocitosis familiares en función de la línea hematopoyética afectada se caracterizan por ser policlonales (es decir, no neoplásicas y sin mutaciones somáticas) por lo que los individuos afectados no sufren progresión a formas más agresivas (MFP o LMA)⁷⁸. Se trata de mutaciones raras con penetrancia completa presentes en todos los familiares afectos⁷⁸. Estas mutaciones afectan a genes implicados en la señalización de citoquinas (incluidos genes mutados en NMP), la señalización de los sensores de oxígeno o la afinidad por el oxígeno de la hemoglobina⁷⁸.

5.3.1 Eritrocitosis Familiar

Estos pacientes se caracterizan por un aumento del número de glóbulos rojos en ausencia de elevación de la cifra de plaquetas o leucocitos¹⁰⁹. Aunque no presentan progresión, estos pacientes tienen mayor riesgo de padecer trombosis que la población general¹⁰⁹. La herencia es mendeliana con patrón autosómico dominante y recesivo según los ge-

nes afectados⁷⁸. Entre estos destacan EPOR y VHL. En el primer caso, las mutaciones en el gen EPOR producen una proteína truncada que elimina el dominio inhibitorio del receptor de la eritropoyetina lo que permite una activación constante de la ruta de señalización a pesar de los bajos niveles de eritropoyetina de estos pacientes¹¹⁰. El gen de von Hippel-Lindau (VHL) es clave en la degradación del factor inducible por hipoxia 1- α (HIF-1 α)¹¹¹. Sus mutaciones en homocigosis (o doble heterocigosis) conllevan unos niveles elevados o inapropiadamente normales de eritropoyetina los que causa la eritrocitosis³⁴. Estas mutaciones son distintas de las presentes en la enfermedad de von Hippel-Lindau de herencia autosómica dominante y caracterizada por la aparición de diversos tumores³⁴. Otros genes mutados implicados en rutas sensoras del oxígeno son EGLN1 y EPAS1 (HIF2 α) con herencia autosómica dominante^{78,112}. Por último, mutaciones en los genes que sintetizan las cadenas de la hemoglobina (fundamentalmente HBB aunque también HBA, con herencia autosómica dominante) y la enzima BPGM (con herencia dominante y recesiva) incrementan la afinidad de la hemoglobina por el oxígeno produciéndose un aumento de eritropoyetina con eritrocitosis secundaria⁷⁸.

5.3.2 Trombocitosis Familiar

Al igual que las eritrocitosis, las trombocitosis familiares pueden ser primarias o secundarias⁷⁸. Las secundarias son debidas a mutaciones en el gen TPPO que codifica para la trombopoyetina⁷⁸. Estas mutaciones mejoran la eficiencia traduccional del mRNA de TPPO incrementando los niveles séricos de esta citoquina y estimulando la trombopoyesis¹¹³. Por otro lado, se han descrito mutaciones germinales en MPL y JAK2 que incrementan la trombopoyesis de manera primaria^{114,115}. En consonancia, estos pacientes presentan niveles de trombopoyetina casi indetectables⁷⁸. Los pacientes con trombocitosis familiar presentan unas tasas de trombosis y hemorragia similares a las de los pacientes con trombocitemia esencial y en el caso de ser secundarias a mutaciones en MPL y JAK2 pueden presentar esplenomegalia⁷⁸.

6. LA GENÓMICA EN EL SIGLO XXI: DE LA SECUENCIA A LA FUNCIÓN Y DEL LABORATORIO A LA CLÍNICA. HERRAMIENTAS PARA DIAGNOSTICAR, PRONOSTICAR CONOCER LA BIOLOGÍA DE LAS NEOPLASIAS MIELOPROLIFERATIVAS.

Como hemos visto a lo largo de esta introducción, el conocimiento de la biología y los determinantes pronósticos de las NMP ha avanzado asombrosamente desde comienzos de este siglo.

Gran parte de este progreso se debe al desarrollo de técnicas moleculares y de secuenciación que fueron diseñadas para estudiar la secuencia y funcionamiento del genoma humano. La secuencia completa del genoma humano se consiguió en el año 2001^{116,117} y posteriormente otros consorcios de investigación como el proyecto 1000 genomas¹¹⁸ o el HapMap¹¹⁹ aportaron información sobre la variabilidad de la secuencia del DNA o cómo esos polimorfismos se heredan o no juntos. Gracias a estos estudios se descubrió que solamente un 1-2% del genoma es codificante¹¹⁷, es decir, se traduce a proteína, lo que unido a la evidencia de que los genes se expresan diferencialmente entre individuos

y tipos celulares puso el foco sobre las regiones reguladores y el epigenoma. El proyecto ENCODE¹²⁰ caracterizó la metilación del DNA, las modificaciones de histonas, la transcripción y la unión de factores de transcripción en distintos tipos celulares ayudándonos a entender cómo funcionan estos elementos reguladores no codificantes.

Un ejemplo de cuán importantes son estas regiones son los estudios globales de asociación genómica (*genome-wide association studies*, GWAS) dirigidos a identificar variantes que aumentan el riesgo de padecer determinadas enfermedades⁸⁹. Al contrario de lo que se pensaba inicialmente, la mayoría de los polimorfismos de riesgo no se encuentran en secuencia codificante sino en regiones no codificantes y por tanto reguladoras de la expresión génica^{121–123}. La caracterización funcional de estos polimorfismos (o secuencias en desequilibrio de ligamiento con los mismos) es fundamental para entender la etiopatogenia de las enfermedades a estudio^{89,121–123}.

Por último, en los últimos años se ha descubierto que la estructura tridimensional de la cromatina afecta a la expresión de los genes^{121,124–126}. Es decir, no solo la secuencia y la regulación epigenética regulan la transcripción, sino que la cromatina en interfase se organiza de manera específica para regular un grupo de genes (a destacar los dominios asociados topológicamente). En este sentido cabe destacar el desarrollo de las llamadas técnicas de conformación cromosómica (3C, 4C, Hi-C, etc.) que permiten conocer qué regiones del DNA interaccionan entre sí y modelar la estructura 3D de la cromatina para entender su funcionamiento^{127,128}.

Por tanto, nos encontramos ante un panorama en el que la obtención de grandes cantidades de información sobre el genoma humano o tumoral es cada vez más sencilla pero su interpretación más complicada. La aplicación de la secuenciación de nueva genera-

ción (*next-generation sequencing*, NGS) ha hecho posible, en el caso de las NMP, la identificación de mutaciones *driver* y no *driver* y su aplicación en el día a día de la práctica asistencial nos permite conocer el perfil mutacional de cada paciente. Sin embargo, faltan estudios que nos permitan integrar toda esta información, generar *scores* pronósticos y modificar estrategias terapéuticas. Además, muchas de las variantes encontradas en los estudios por NGS no están descritas ni caracterizadas por lo que su interpretación debe hacerse con cautela en espera de que se demuestre su patogenicidad¹²⁹. Así mismo, todavía queda mucho por conocer sobre los mecanismos que median el riesgo de sufrir una NMP. El estudio de la estructura tridimensional del genoma podría ser determinante.

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

I. JUSTIFICACIÓN

Aunque desde el descubrimiento de las mutaciones de JAK2 en 2005 el conocimiento de las bases moleculares de las neoplasias mieloproliferativas ha avanzado espectacularmente, todavía queda mucho camino para entender la biología y determinantes pronósticos de este grupo de enfermedades. Algo más de un 10% de las trombocitemias esenciales y mielofibrosis primarias, las denominadas Triples Negativas, no presentan ninguna de las mutaciones *driver* conocidas, lo que dificulta su diagnóstico. Además, no se conoce de forma completa el papel que las mutaciones en genes no *driver* juegan en el inicio, progresión y complicaciones de las neoplasias mieloproliferativas. A esto hay que añadir que, pese a que se conoce la importancia de las variantes genéticas en el riesgo de padecer neoplasias mieloproliferativas habiéndose identificado numerosos polimorfismos asociados al mismo, muy pocas variantes han sido caracterizadas como causales. El desarrollo en los últimos años de las técnicas de secuenciación ha permitido su aplicación en clínica e investigación. La posibilidad de secuenciar paneles amplios de genes y exomas enteros y el diseño de técnicas que permiten estudiar las interacciones y estructura del genoma puede ayudarnos a mejorar el diagnóstico, estratificación pronóstica y conocimiento biológico de las NMP.

2. HIPÓTESIS DE TRABAJO

1. A pesar de presentar mutaciones *driver* características, el perfil mutacional de las Neoplasias Mieloproliferativas es complejo y tiene influencia en la biología y pronóstico de la enfermedad.
2. El uso de la secuenciación de nueva generación para estudiar un panel de genes implicados en patología mieloide puede ayudarnos a mejorar el diagnóstico y establecer el pronóstico de pacientes con NMP.
3. El estudio de paneles de genes y la secuenciación completa del exoma pueden ayudarnos a identificar nuevas mutaciones que expliquen la biología de la enfermedad además de ayudarnos a estudiar neoplasias mieloproliferativas familiares y síndromes NMP-*like* (trombocitosis y eritrocitosis familiares).
4. El riesgo genético de padecer neoplasias mieloproliferativas esporádicas puede estar mediado por regiones reguladoras del genoma. Las técnicas de conformación cromosómica, que estudian las interacciones y estructura del genoma, pueden ayudarnos a explicar los mecanismos por los que estas variantes aumentan el riesgo. El llamado haplotipo 46/1 de JAK2 podría ser un ejemplo de ello.

3. OBJETIVOS

1. Evaluar la utilidad del estudio de un panel de genes implicados en patología mieloide para el diagnóstico, pronóstico y estudio de la biología de las Neoplasias Mieloproliferativas.
 - a. Evaluación de la utilidad diagnóstica en contexto asistencial.
 - b. Establecer el valor pronóstico (supervivencia global, progresión, trombosis) de las mutaciones encontradas.
 - c. Hacer una propuesta de marcadores a incluir en los *scores* pronósticos de MFP, TE y PV.
2. Caracterizar biológicamente algunas de las mutaciones de interés identificadas en casos de NMP o NMP-like.
 - a. Realización de ensayos de luciferasa para observar la actividad transcripcional de STAT5 en presencia de la mutación. Estudiar la sensibilidad al inhibidor de JAK ruxolitinib si procede.

b. Realización de estudios de proliferación en presencia de la mutación para identificar sus efectos sobre la misma y cuantificar la sensibilidad y/o independencia a citoquinas.

3. Identificar, mediante secuenciación completa del exoma, variantes causales de Neoplasias Mieloproliferativas Familiares.

4. Caracterizar funcionalmente el Haplotipo 46/1 de JAK2 para intentar explicar el incremento del riesgo de padecer NMP.

a. Uso de datos del estudio *Progression of Early Subclinical Atherosclerosis* (PESA) para el estudio de variantes clínicas, analíticas, RNA-seq y proteoma en función del haplotipo.

b. Realización de experimentos de Captura Circularizada de la Conformación Cromosómica (4C-seq) para estudiar la estructura e interacciones diferenciales del haplotipo 46/1.

i. Modelado 3D para intentar identificar cambios en el plegamiento de la región.

ii. Identificar interacciones que nos permitan encontrar genes candidatos a una regulación diferencial entre haplotipos.

c. Estudio de la expresión de genes candidatos en distintos tipos celulares mediante sorting celular y PCR cuantitativa.

5. Integrar toda la información obtenida en un modelo que intente explicar la biología e historia natural de las NMP.

MATERIALES Y MÉTODOS

I. PACIENTES

Se seleccionaron estudios de mutaciones en genes relacionados con patología mieloide por NGS (panel mieloide) realizados en el Laboratorio de Biología Molecular del Servicio de Hematología del Hospital Universitario 12 de Octubre dentro del proceso de actividad asistencial cuyo motivo de petición incluyera sospecha o diagnóstico de NMP. Las fechas de recogida fueron entre el 19/06/2016 y el 11/03/2020 recogándose en total datos de 140 pacientes. La mediana de seguimiento desde el diagnóstico fue de 1.9 años (rango de 0-27.69). Las características clínicas y perfil mutacional de los pacientes se encuentran resumidos en la Tabla 6. Los datos clínicos se obtuvieron de la historia clínica electrónica. A estos estudios se sumaron 16 pacientes con TE-TN de nuestro biobanco, como veremos más adelante. Esta parte del proyecto de tesis fue aprobada por el Comité Ético del Hospital Universitario 12 de Octubre con Nº CEI 20/436.

Los datos clínicos y de RNA-seq y Proteoma se obtuvieron a través del Proyecto PESA (*Progression of Early Subclinical Atherosclerosis*) de la Fundación Centro Nacional de Investigaciones Cardiovasculares Carlos III. Se trata de un estudio observacional prospectivo cuyo objetivo es determinar la prevalencia de progresión a los 6 años de la aterosclerosis subclínica mediante imagen cardiovascular. En este estudio se toman muestras biológicas al inicio del estudio, a los tres y a los seis años, de las cuales están disponibles los datos de RNA-seq y Proteoma de 509 pacientes (un 36% sin enfermedad, un 12% con enfermedad focal, un 16% con enfermedad intermedia y un 36% con enfermedad

generalizada según el score PESA) para las visitas 1 y 2. Se solicitó al Comité Científico del estudio PESA la aprobación del estudio *“Influence of the 46/1 Haplotype of JAK2 on the blood transcriptome of healthy individuals”* y 50ng de DNA de los pacientes para su haplotipado.

Tabla 6.

Resumen de características clínicas y perfil mutacional de la serie global.

DAT: mutaciones en DNMT3A, ASXL1 o TET2. ‘Sin Patología Mieloide’ se refiere a aquellos pacientes que fueron diagnosticados de benignidad (p.e. trombocitosis reactiva).

N=140		
Sexo (n)	Varón	54.3% (76)
	Mujer	45.7% (64)
Edad al Diagnóstico	Años, mediana (rango)	55.71 (1.26-84.06)
Motivo de Petición (n)	Búsqueda de Clonalidad	53.6% (75)
	Definición diagnóstica	15.7% (22)
	Pronóstica	15% (21)
	Progresión	15.7% (22)
Diagnóstico (n)	Trombocitemia Esencial	37.9% (53)
	Policitemia Vera	7.9% (11)
	Mielofibrosis Primaria	15.7% (22)
	SMD/NMP	9.3% (13)
	Otras Patologías	2.1% (3)
	Sin Patología mieloides	23.6% (33)

N=140		
Mutaciones detectadas por el panel (n)	Sí	77.9% (109)
	No	22.1% (31)
Número de mutaciones	Mediana (rango)	2 (0-7)
Vías Mutadas (n)	Tirosinas cinasa y sus rutas	57.1% (80)
	Factores de transcripción	20.7% (29)
	Supresores de tumor	6.4% (9)
	Modificadores epigenéticos	34.3% (48)
	Factores de splicing	19.3% (27)
	Cohesinas y otros	3.6% (5)
	DAT	25.7% (36)
Características y Evolución Clínica (n)	Factores de riesgo cardiovascular	45.7% (48)
	Trombosis	7.1% (7)
	Hemorragia	3.1% (3)
	Exitus	9.6% (11)

Para la realización del experimento 4C-seq y las PCRs cuantitativas sobre distintos tipos celulares se utilizaron 20ml de sangre periférica obtenidos de donantes sanos. Estos donantes sanos firmaron el consentimiento informado correspondiente al proyecto ‘Caracterización funcional del Haplotipo 46/1 de JAK2 y su implicación en la etiopatogenia de las Neoplasias Mieloproliferativas’ y aprobado por el Comité Ético del Hospital Universitario 12 de Octubre con N° CEI 16/096.

2. EXTRACCIÓN DNA Y RNA

2.1 Extracción de ácidos nucleicos mediante columnas y elución

La mayoría de extracciones de ácido nucleicos se realizó mediante el método de columnas (AllPrep® DNA/RNA/Protein Mini Kit de Qiagen) siguiendo las especificaciones del fabricante. Con este método las muestras se homogenizan primero con *buffer* RLT el cual inactiva DNasas, RNasas y proteasas. Posteriormente el lisado se centrifuga a través de una columna *AllPrep* DNA. Esta columna, utilizando además un *buffer* con alta concentración de sales fija de manera selectiva y eficiente el DNA genómico. Tras esto la columna es lavada y finalmente el DNA es eluído para su utilización en los siguientes experimentos. Para la obtención de RNA, al eluído de la columna *AllPrep* DNA se le añade etanol mejorando las condiciones de unión del RNA a la columna *RNeasy* desde donde es eluído en agua libre de RNasas tras varios lavados.

2.2 Extracción de DNA automatizada con bolas magnéticas

Para la extracción rápida de DNA se utilizó también en ocasiones la tecnología Maxwell® que permite una extracción automatizada de DNA a partir de 400 µl de sangre periférica. La extracción y purificación de DNA está basada en el uso de partículas paramagnéticas usando las especificaciones del fabricante. El instrumento utilizado fue el Maxwell® 16 con el Maxwell 16 Blood DNA Purification Kit de Promega.

3. TRANSCRIPCIÓN REVERSA PARA LA OBTENCIÓN DE CDNA

La técnica de PCR cuantitativa a Tiempo Real requiere cDNA (DNA complementario) para cuantificar la expresión diferencial de genes. Este cDNA se obtiene a partir de mRNA mediante retrotranscripción. Para ello se utilizó un kit de transcripción reversa según especificaciones (High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit with RNase Inhibitor de Thermo Fisher Scientific).

4. PCR CUANTITATIVA

La cuantificación de la expresión diferencial de genes se realizó mediante TaqMan® Gene Expression Assays (Thermo Fisher Scientific) según las especificaciones del fabricante. La PCR cuantitativa se realizó en un Instrumento de PCR a Tiempo Real Quantum Studio® 5 (Applied Biosystems). Como gen control con el que normalizar los resultados se usó GAPDH. En la Tabla 7 se especifican los ensayos realizados (en todos ellos con sondas marcadas con FAM-MGB).

Tabla 7.

Genes estudiados por PCR Cuantitativa en Tiempo Real

GEN	IDENTIDAD DE ENSAYO
JAK2	Hs01078136_m1
CD274 (PDL-1)	Hs00204257_m1
PDCD1LG2 (PDL-2)	Hs00228839_m1
KIAA1432	Hs00405030_m1
GAPDH	Hs02786624_g1

5. SECUENCIACIÓN SANGER

Algunas de las mutaciones identificadas por secuenciación masiva fueron validadas por secuenciación Sanger. Para la amplificación se utilizó una polimerasa de alta fidelidad (Phusion Flash II DNA Polymerase de Thermo Fisher Scientific) según las especificaciones del fabricante. Posteriormente se utilizó ExoSAP (Thermo Fisher) para limpiar el producto de PCR también según especificaciones. Posteriormente la reacción de secuenciación se llevó a cabo con un sistema BigDye® Terminator v3.1 (Thermo Fisher Scientific) tras lo cual se llevó a cabo una purificación basada en resina (XTerminator® BigDye, Thermo Fisher Scientific) antes de secuenciar las muestras en un secuenciador ABI Prism 3131 (Thermo Fisher Scientific). Los primers utilizados se encuentran en la Tabla 8.

Tabla 8.

Secuencia de los primers utilizados para la secuenciación Sanger de pacientes

PRIMER	SECUENCIA 5'-3'
JAK2_R683G_1F	TTTTGGGGGCTTGAACATAC
JAK2_R683G_1R	TTACACCACTGCCCAAG
MPL_MUT_1F	CCGAAGTCTGACCCTTTTGTG
MPL_MUT_1R	ACAGAGCGAACCAAGAATGC

6. ESTUDIO DE UN PANEL DE GENES IMPLICADOS EN PATOLOGÍA MIELOIDE POR SECUENCIACIÓN DE NUEVA GENERACIÓN (NGS)

Para el estudio del perfil mutacional de los pacientes con Neoplasias Mieloproliferativas se utilizó la tecnología y protocolos usados de manera rutinaria en el Laboratorio de Biología Molecular del Servicio de Hematología y Hemoterapia del Hospital Universitario 12 de Octubre. Para ello se utiliza la plataforma Ion Torrent en el secuenciador Ion Torrent S5XL System—Thermofisher Scientific. De manera resumida, esta tecnología está basada en un sistema de semiconducción iónica (en contraposición a la tecnología Illumina® que es óptica) de manera que detecta la liberación de hidrógenos (H⁺) durante la polimerización de las cadenas de DNA. De esta forma el sistema detecta cambios del pH con la adición de bases (A, T, C, G) que el sistema va añadiendo cíclicamente. El flujo de trabajo que paso a describir y el racional de la tecnología Ion Torrent® queda resumido en la Figura 1.

6.1 Diseño de Amplicones

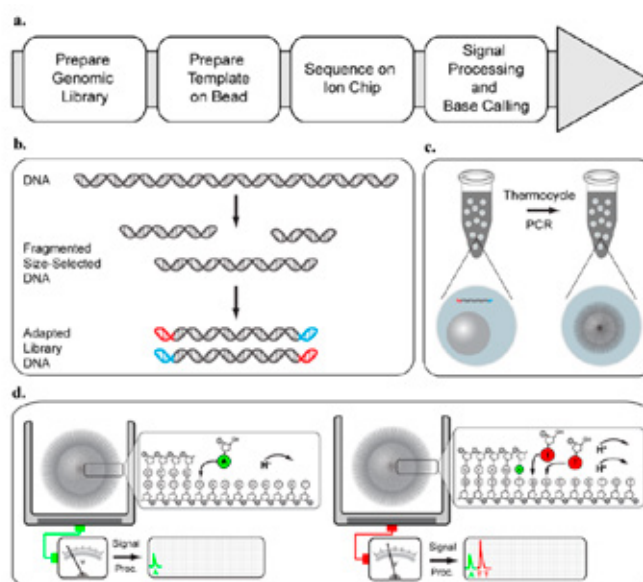
El primer paso para la utilización de la NGS es la selección de genes (o fragmentos de interés) que deseamos secuenciar en nuestras muestras. Para ello se utilizó el programa

Ion AmpliSeq® Designer (Thermo Fisher Scientific) para diseñar los amplicones, esto es los fragmentos a amplificar y seleccionar. Aunque parte de las muestras fueron secuenciadas con un panel de 33 genes en 1180 amplicones (aquellas secuenciadas antes de marzo de 2018) en la actualidad el panel utilizado está compuesto por 1075 amplicones con los que se secuencian total o parcialmente 43 genes implicados en patología mieloide (Leucemia Mieloide Aguda (LMA), Síndromes Mielodisplásicos (SMD), Neoplasias Mieloproliferativas (NMP) y Neoplasias Mielodisplásicas/Mieloproliferativas (SMD/NMP) (Tabla 9)

Figura 1.

Resumen tecnología Ion Torrent®

Imagen tomada de Rothberg JM et al, Nature 2011¹³⁰. a. Flujo de trabajo: preparación de librería genómica, fijación a las partículas magnéticas para su amplificación, secuenciación en chip y procesamiento de la señal y obtención de datos. b. Para preparar la librería primero se amplifican las regiones de interés, posteriormente se fragmenta el DNA y se ligan los adaptadores. c. Se fija la librería a las partículas magnéticas y se lleva a cabo la amplificación de la misma. d. Secuenciación en el chip: los primers de secuenciación y la DNA polimerasa se encuentran unidos a las partículas magnéticas, éstas se pipeteen dentro del pocillo de carga. El chip se instala en el secuenciador, los cuatro nucleótidos fluyen cíclicamente. Cuando se une un nucleótido se libera un protón H^+ cambiando el pH y emitiéndose una señal que es registrada.



6.2 Generación de Librerías

La preparación de librerías se realizó según con el kit Ion AmpliSeq® Library que contiene las parejas de *primers* correspondientes a los amplicones diseñados. Por lo general se parte de 30ng de DNA genómico con el cual se realiza una amplificación de las secuencias diana mediante una PCR convencional con 14 ciclos de amplificación. Posteriormente se lleva a cabo la digestión de los *primers* con la enzima FuPa y por último se procede a la ligación de los adaptadores con sus respectivos códigos de barras utilizando una enzima ligasa.

Tabla 9.

Panel de genes seleccionados incluyendo grupo funcional al que pertenecen además de locus secuenciados y número de amplicones

FUNCIÓN	GEN	CHR.	INICIO	FIN	Nº AMPLICONES
Cohesinas y otros	EGLN1	1	231502062	231557733	10
	NPM1	5	170814868	170837656	13
	RAD21	8	117859710	117878977	20
	SMC1A	X	53406965	53449648	33
	STAG2	X	123156407	123234509	50
Factores de Splicing	SF3B1	2	198256921	198299857	44
	PRPF40B	12	50017325	50038043	31
	SRSF2	17	74732208	74733436	5
	U2AF1	21	44513191	44527685	10
	SF3A1	22	30730553	30752861	23
	ZRSR2	X	15808512	15841397	14
Factores de Transcripción	EPAS1	2	46525036	46611847	22
	WT1	11	32410545	32456973	16
	ETV6	12	11802967	12044078	12
	CEBPA	19	33792147	33793455	9
	RUNX1	21	36164287	36421263	18
	PHF6	X	133511597	133559416	14

FUNCIÓN	GEN	CHR.	INICIO	FIN	Nº AMPLICONES
Reguladores Epigenéticos	DNMT3A	2	25457047	25536929	33
	IDH1	2	209101731	209116356	12
	TET2	4	106154899	106197684	37
	EZH2	7	148504657	148544423	23
	KMT2A	11	118307241	118393002	81
	IDH2	15	90627367	90635017	17
	SETBP1	18	42281301	42643812	30
	ASXL1	20	30954122	31025231	33
	BCOR	X	39911228	39937243	39
	KDM6A	X	44732709	44970753	46
	BCORL1	X	129139130	129190192	41
Supresores de tumor	VHL	3	10183360	10191667	6
	TP53	17	7572852	7579966	15
	NF1	17	29422227	29701206	95
Tirosina cinasas y sus vías	CSF3R	1	36931652	36945167	26
	MPL	1	43803488	43818462	16
	NRAS	1	115251106	115258821	5
	THPO	3	184090090	184096202	13
	KIT	4	55524176	55604767	27
	JAK2	9	5021946	5126835	38
	CBL	11	119077080	119170509	23
	KRAS	12	25362705	25398385	7
	SH2B3	12	111855923	111886159	13
	FLT3	13	28578144	28644795	28
	EPOR	19	11488599	11495008	14
	CALR	19	13049460	13054786	13

6.3 Amplificación de la Librería en partículas magnéticas

Tras la generación de librerías, éstas se purifican utilizando partículas magnéticas (AMPure® XP Reagent (Beckman Coulter), y se lleva a cabo una normalización a una concentración de 100 pM. Tras esto se procede a la amplificación sobre partículas magnéticas mediante una PCR en emulsión. Durante este proceso una única cadena de DNA se une a la partícula y se replica de forma clonal creando lo que se denomina cluster. Para ello se utilizó Ion Chef® System, según el protocolo Ion PI Hi-Q™ Chef Kit User Guide.

6.4 Secuenciación y obtención de datos

Finalmente se recuperan las microesferas con el material amplificado y se inyectan al chip que es secuenciado en el Ion Torrent S5XL System (ThermoFisher Scientific). Cada amplicón es secuenciado más de 2000 veces lo que hace que el número de lecturas por muestra supere los 2.5 millones. Tras esto el programa Torrent Suite®, mediante un proceso denominado *base calling* emite varios ficheros que incluyen los 'datos crudos' de secuenciación además de datos de la calidad de las secuencias.

6.5 Análisis final y selección de variantes

Los datos se transfieren al programa Ion Reporter® de donde se obtiene un archivo con todas las variantes anotadas. Este archivo contiene una gran cantidad de campos que incluyen el número de lecturas, la frecuencia alélica de cada variante (VAF), si esta es sinónima, sin sentido, con cambio de sentido o altera un sitio de splicing o su frecuencia en bases poblacionales (dbSNP (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp>), 1000 Genomes Project (<http://browser.1000genomes.org>), ExAc (repositorio en <https://gnomad>).

broadinstitute.org/). Además, también aporta información sobre si ha sido descrita en tumores (Catalog of Somatic Mutations in Cancer (<http://cancer.sanger.ac.uk/cosmic>), ClinVar (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/>) y la patogenicidad que la asignan distintos modelos predictivos (PolyPhen2 (<http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2>), SIFT (<http://sift.jcvi.org>)).

De manera general se descartan variantes con una cobertura total de menos de 70 lecturas y/o menos de 10 lecturas de la variante. Posteriormente se sacan del análisis aquellas variantes sinónimas o en regiones no codificantes y aquellas descritas en bases poblacionales en más de un 1% de la población. Por último, se evalúa la patogenicidad de la variante en función de su presencia en bases de datos clínicas o su puntuación en modelos predictores.

7. HAPLOTIPADO

La determinación del polimorfismo rs10974944 de JAK2, que marca el haplotipo 46/1 fue realizada mediante un ensayo de identificación de genotipos de polimorfismos de un solo nucleótido (SNP) TaqMan® (C_31941696_10) (Thermofisher) siguiendo las instrucciones del fabricante. Cada ensayo de identificación de genotipos de SNP TaqMan incluye dos sondas de MGB TaqMan específicas de alelo que contienen colorantes fluorescentes diferentes y un par de primers de PCR para la detección SNP específicos (Figura 2 y Figura 3).

Figura 2.
Representación de la Tecnología de Identificación de Genotipos de
SNP TaqMan®
Imagen tomada de las especificaciones del fabricante¹³¹.

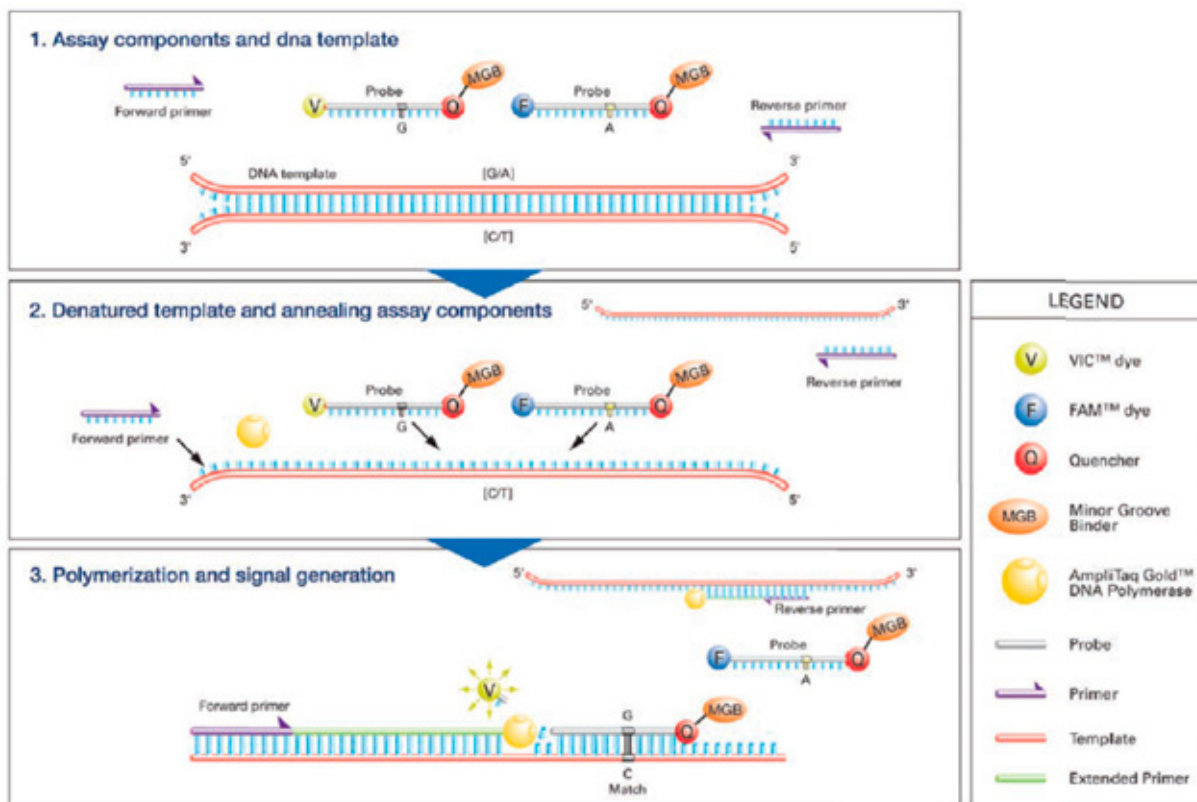
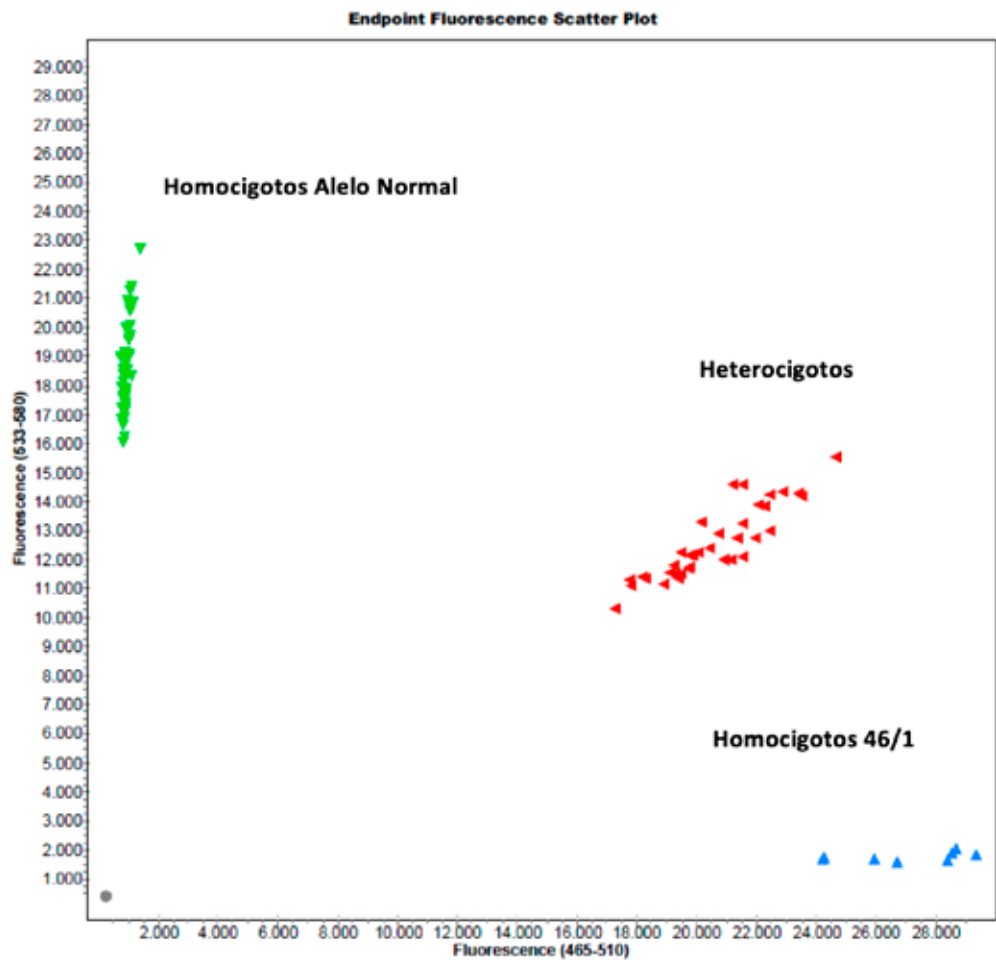


Figura 3.

Ejemplo de haplotipado de JAK2

El alelo G (FAM) marca el haplotipo 46/1 y el C (VIC) el haplotipo normal.



8. SEPARACIÓN CELULAR MEDIANTE GRADIENTE CON FICOLL

Las células mononucleadas y neutrófilos, tanto para la separación mediante citometría como para la obtención de neutrófilos para la realización del experimento 4C, se separaron mediante una centrifugación en gradiente de densidad (Ficoll-Paque® PLUS, GE Healthcare) a 300g durante 30 minutos sin freno de parada y a 4°C. Las células mononucleadas se encuentran entre la fase de ficoll y la de plasma y los neutrófilos bajo el ficoll junto a los hematíes.

La fase de neutrófilos fue hemolizada para eliminar los hematíes y lavada con PBS y las células mononucleadas lavadas con PBS previo marcaje y separación por citometría (centrifugaciones a 250g durante 5 minutos).

9. SEPARACIÓN CELULAR POR CITOMETRÍA (SORTING)

La separación de las células mononucleadas se realizó con un citómetro separador BD FACSAria™ Fusion (BD Biosciences, San Jose, CA, Estados Unidos) equipado con 3 láseres: un diodo láser de estado sólido de 405 nm, un láser de estado sólido de 488 nm y un láser helio-neón de 633 nm que permite la separación de 4 poblaciones celulares al mismo tiempo. Se realizó la separación a una presión de 45 psi (*pounds-force per square inch*) y con un *nozzle* de 85 µm. Se separaron las células en modo de recogida, con una eficiencia superior al 95%, para obtener una pureza final siempre superior al 90%.

Se separaron 4 poblaciones celulares: monocitos, linfocitos B CD19+, linfocitos T CD3+ y células NK CD56+. Para ello, se utilizaron los siguientes anticuerpos monoclonales conjugados con fluorocromos: anti-CD3-PE/Cy7, anti-CD19-PE y anti-CD56-APC (todos ellos a una dilución 1/100) (Tabla 10).

La estrategia de análisis consistió en descarte de dobletes, selección de las células viables mediante marcaje con DAPI (4',6-diamidino-2-fenilindol) y posterior selección de las poblaciones de interés mediante selección por *side scatter channel* (SSC) y *forward scatter channel* (FSC) y marcaje de anticuerpos. Los monocitos fueron seleccionados por SSC y FSC y las poblaciones linfocitarias por inmunofluorescencia (Figura 4).

Figura 4.

Estrategia de análisis para realización de *sorting* celular

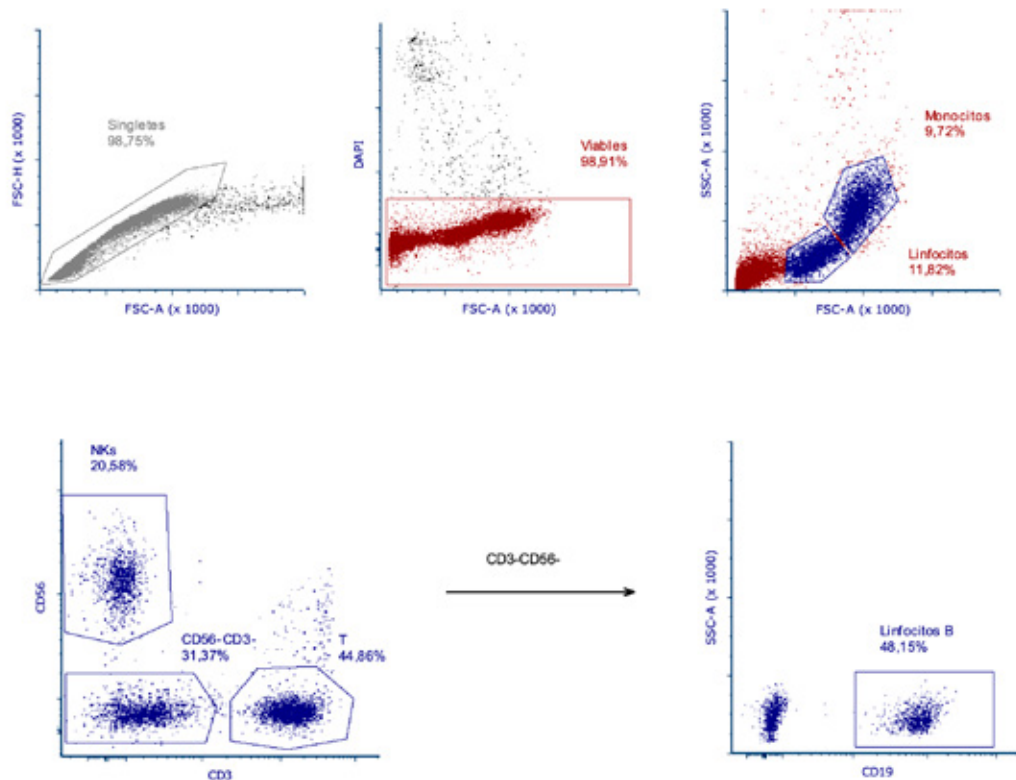


Tabla 10.

Anticuerpos y DAPI (4 ‘,6-diamidino-2-fenilindol) utilizados para el *sorting* celular.

ANTÍGENO	DILUCIÓN	CLON	FLUOROCROMO	PROCEDENCIA
CD3	1:100	UCHT1	PE/Cy7	Biolegend (San Diego, CA, Estados Unidos)
CD19	1:100	SJ25C1	PE	Biolegend (San Diego, CA, Estados Unidos)
CD56	1:50	HCD56	APC	Biolegend (San Diego, CA, Estados Unidos)
DAPI	2 µg/ml			Sigma-Aldrich Merck Group (St. Louis, MO, Estados Unidos)

10. CARACTERIZACIÓN FUNCIONAL DE MUTANTES DE JAK2 Y MPL

Estos experimentos fueron realizados por la Dra. Leila Varghese (Signal Transduction Unit, Ludwig Institute for Cancer Research, Bruselas, Bélgica).

10.1 cDNA

Los cDNAs de los receptores humanos TPOR (MPL), EPOR, GCSFR y de la proteína murina STAT5a fueron subclonados dentro del plásmido pMX-IRES-GFP y el cDNA de JAK2 fue clonado en el plásmido pMEGIX. Se realizó mutagénesis dirigida utilizando el método Quikchange (Agilent), la cual fue verificada mediante secuenciación Sanger (Macrogen Europe).

10.2 Ensayos Duales de Actividad de Luciferasa

Como se ha comentado previamente, tanto los receptores de citoquinas como JAK2 median su actividad a través de proteínas como STAT5. Por tanto, uno de los métodos para estudiar la actividad de estas rutas es medir la actividad transcripcional de STAT5.

Para determinar la actividad transcripcional de STAT5 de las distintas variantes de MPL y JAK2 se realizaron ensayos de luciferasa. Estos estudios se realizaron en células

HEK293T cultivadas en medio DMEM (*Dulbecco's Modified Eagles Medium*) suplementado con 10% de FBS (Suero Bovino Fetal). Las células fueron transfectadas de manera transitoria para sobreexpresar TPOR (mutado o sin mutar), EPOR o GCSFR y o bien JAK2 normal o JAK2 mutado R683G en los experimentos necesarios además de con STAT5a. Se usó el reportero de STAT5 pSpi-Luc¹³² junto al plásmido pRL-TK que contiene el gene de la luciferasa renilla como control interno. Las células HEK293T fueron transfectadas en medio OptiMEM sin suero usando lipofectamina 2000 (Thermo Fisher). Los ensayos duales de luciferasa se realizaron de manera descrita previamente en la literatura⁴². Las células fueron o no estimuladas con 10 ng/mL de trombopoyetina recombinante (TPO, Miltenyi Biotec) y tratadas o no con 1 μ M de ruxolitinib (Cayman Chemicals) 4 horas tras la transfección. La luminiscencia se midió usando un kit de ensayos duales de luciferasa (Promega) en un luminómetro (GlowMax Discover luminometer (Promega)).

10.3 Estudios de Proliferación

Otra manera de estudiar el efecto de las mutaciones en receptores de citoquinas y proteínas implicadas sus rutas de señalización son los estudios de proliferación. Las células HEK293T se cultivaron en medio DMEM con 10% de FBS. La línea celular murina Pro-B dependiente de interleuquina 3 (IL-3) Ba/F3 se cultivó en medio RPMI con 10% de FBS y suplementos de IL3.

Se generaron retrovirus ecotrópicos mediante transfección transitoria de células HEK293T con TPOR normal y mutado usando el reactivo TransLT1 (Mirus). Las células Ba/F3 fueron infectadas con supernadantes virales y seleccionadas por expresión de GFP como ha sido previamente descrito⁴².

La proliferación en ausencia de citoquinas fue medida utilizando el ensayo de viabilidad celular por luminiscencia CellTitre Glo. De manera resumida, las células fueron lavadas en medio sin factores de crecimiento y posteriormente cultivadas empezando a una densidad de 100.000 células por mililitro de medio sin factores. Las células viables se contaron a los 3, 5 y 7 días después de la retirada de citoquinas, habiendo sido divididos los cultivos a 1/10 para mantener las células a una densidad óptima.

II. SECUENCIACIÓN COMPLETA DE EXOMAS

Los exomas de las familias con Neoplasias Mieloproliferativas y Trombocitosis Familiares fueron realizados por la empresa NIMGenetics. El protocolo resumido es el siguiente:

II.1 Control de Calidad de las muestras

La concentración de las muestras se analizó mediante cuantificación fluorimétrica con el sistema Qubit (Thermo Fisher Scientific Inc), la pureza mediante espectrofotometría con el sistema NanoDrop (Thermo Fisher Scientific Inc), y la integridad del DNA mediante electroforesis en TapeStation (Agilent Technologies).

II.2 Fragmentación del DNA, preparación y control de calidad de las librerías

La generación de librerías se realizó con tecnología SureSelect^{XT} Human All Exon V6 (Agilent Technologies), a partir de DNA genómico fragmentado (150-200 pb) mediante Covaris. El panel diseñado captura 431409 exones en 23245 genes. La tecnología SureSelect^{XT} Human All Exon V6 proporciona una alta eficiencia en el enriquecimiento, con un elevado porcentaje de bases *on-target* y una alta uniformidad en la cobertura. El

output fue de ~4-5 Gb/muestra, correspondientes a ~40-50 millones de lecturas/muestra y una profundidad media de lectura de 50X. La calidad de las librerías amplificadas se evaluó mediante TapeStation (Agilent Technologies).

11.3 Captura, enriquecimiento, y control de calidad de las librerías capturadas

A partir de las librerías amplificadas, se capturaron las regiones genómicas de interés mediante el uso de sondas de RNA de 120 pb (SureSelect^{XT}). Se indexaron, amplificaron y purificaron las librerías capturadas y determinó su calidad mediante TapeStation (Agilent Technologies). Las librerías generadas se normalizaron y combinaron en concentraciones equimoleculares para la generación óptima de los *clusters* de DNA.

11.4 Secuenciación

La secuenciación *paired-end* (2x100 pb) se realizó en la plataforma NovaSeq 6000 (Illumina, Inc).

11.5 Análisis Bioinformático

Las lecturas obtenidas con el secuenciador se analizaron usando una *pipeline* que integra tanto softwares comerciales como de desarrollo propio (NIMGenetics).

Se recibieron los datos crudos (FASTQ), las secuencias alineadas (BAM) y los listados de variantes en formato VCF a través del servidor FTP de NIMGenetics.

11.6 Análisis de Variantes

Para la selección de variantes de interés utilizamos un algoritmo similar al utilizado por Harutyunyan et al⁸⁶. Primero se seleccionaron mutaciones con una cobertura de al menos 10X y presentes en una frecuencia alélica (VAF) de al menos un 25% ya que estamos buscando mutaciones germinales. Tras esto se descartaron aquellas mutaciones sinónimas o localizadas en regiones no codificantes. Por último, se eliminaron aquellas variantes presentes con una MAF > 0.01 (proyecto de los 1000 Genomas (<https://www.internationalgenome.org/>)).

I2. CAPTURA CIRCULARIZADA DE LA CONFORMACIÓN CROMOSÓMICA: 4C-SEQ

Las técnicas de captura de conformación cromosómica (tecnologías 3C) nos permiten estudiar qué regiones del genoma están próximas (es decir, interaccionan) a otras independientemente de su distancia genómica linear. Aunque en los últimos años se han diseñado distintas técnicas¹³³, todas ellas se basan en la fijación de la cromatina y sus proteínas con paraformaldehído. Esto se sigue de una serie de digestiones y ligaciones que generan fragmentos de DNA quiméricos de distintas secuencias que interaccionan entre sí. Estos fragmentos son amplificados y (según las técnicas) secuenciados posteriormente para estudiar de manera semicuantitativa o cuantitativa las interacciones de una o distintas regiones (Figura 5). La técnica utilizada en esta tesis para analizar las distintas interacciones del Haplotipo 46/1 fue la Captura Circularizada de la Conformación Cromosómica o 4C-seq que permite estudiar las interacciones de determinadas regiones o secuencias de interés (*viewpoints* en la terminología inglesa) con el resto del genoma. Por ello esta técnica se denomina uno versus todo (Figura 6).

Figura 5.

Técnicas de Captura de Conformación Cromosómica

El primer panel muestra el racional común a todos los métodos (la captura de interacciones). El resto de paneles resumen las distintas técnicas y especifican el número de interacciones que interrogan.

Figura tomada de Li et al.¹³³

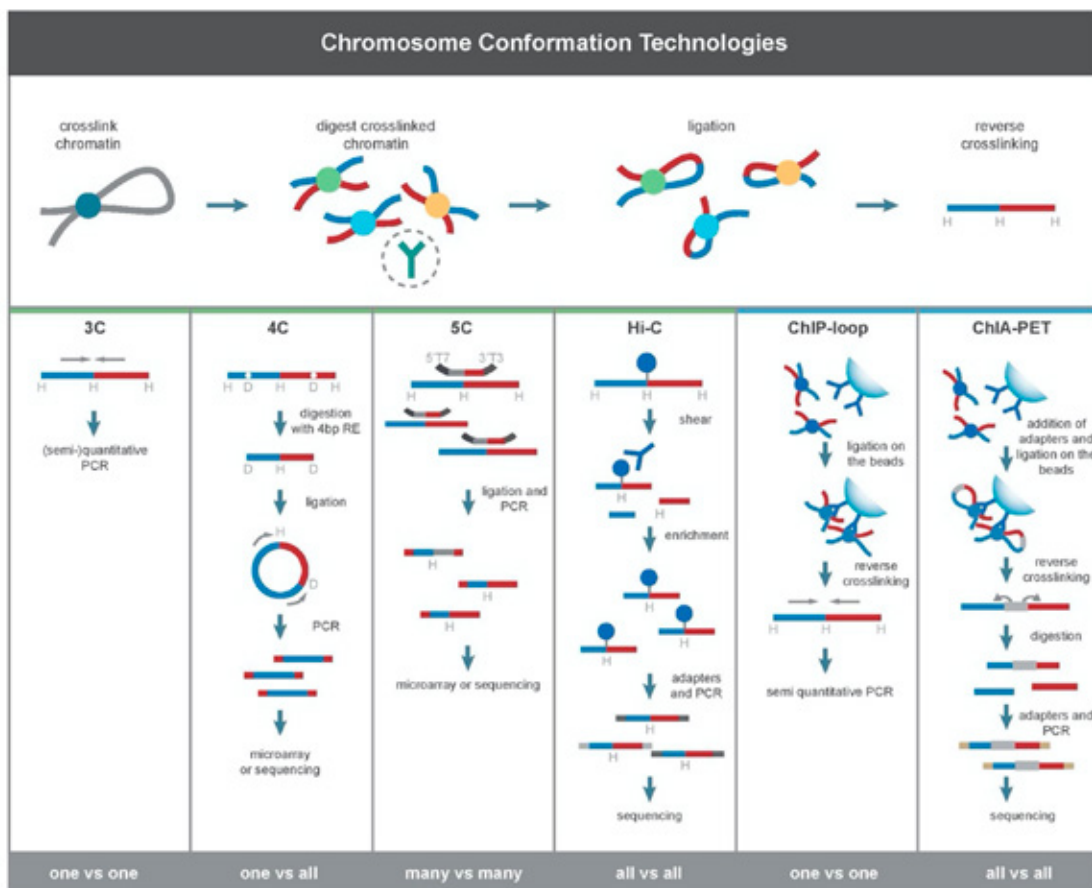
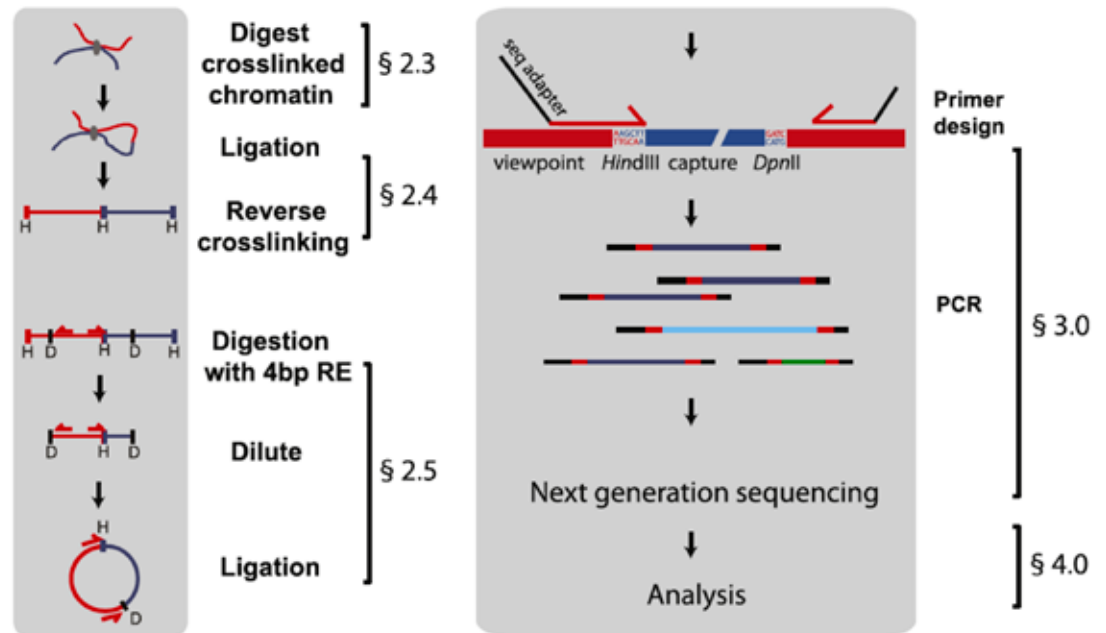


Figura 6.

Resumen de la técnica de Captura Circularizada de Conformación Cromosómica (4C-seq).

Imagen tomada de Splitner E et al.¹²⁸



12.1 Diseño de Viewpoints

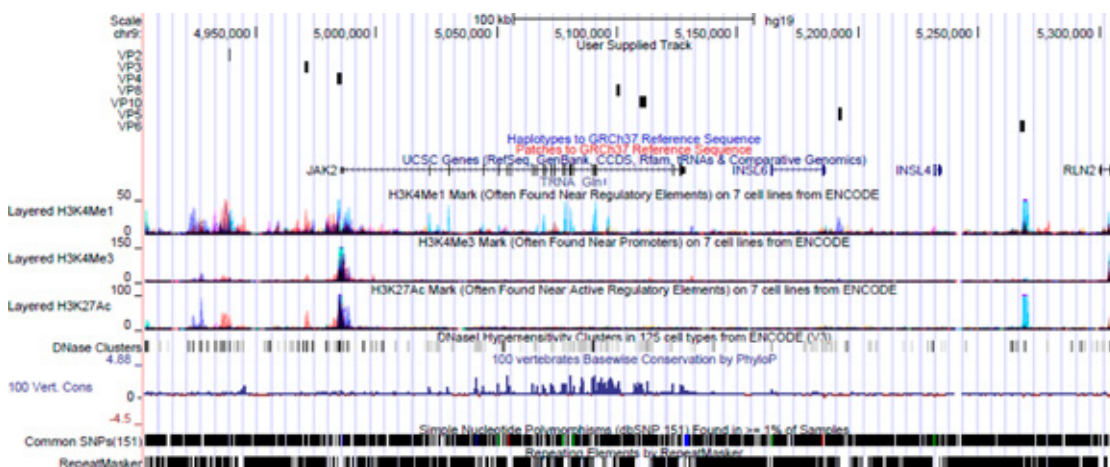
A la hora de analizar regiones no codificantes unos de los primeros pasos es hacer uso de bases de datos públicas que contengan información de la región a estudiar (por ejemplo, marcas de histonas o sitios de unión de factores de transcripción). En este caso nos interesaban regiones dentro del haplotipo con potencial regulador. Para ello utilizamos el *Genome Browser* de la University of California de Santa Cruz (<https://genome.ucsc.edu>) usando como marcadores de posible actividad reguladora datos del proyecto ENCODE (H3K4Me1, H3K4Me3, H3K27Ac, *clusters* de sensibilidad a DNAsa y lugares

de conservación en vertebrados) (Figura 7). Se consideró que el haplotipo tiene las coordenadas aproximadas chr9:4,929,562-5,244,096 utilizando datos de HapMap (<https://hapmap.org>).

Figura 7.

Captura del Genome Browser de UCSC con algunos de los Viewpoints diseñados (VP2-6, VP8 y VP10)

Muestra los genes, las marcas de histonas, lugares sensibles a DNAsa, regiones conservadas y repeticiones.



Como hemos comentado previamente la técnica 4C-seq nos permite identificar las interacciones que presenta una región determinada (*viewpoint*) con el resto del genoma. A la hora de seleccionar o diseñar un *viewpoint* debemos tener en cuenta los siguientes requisitos:

1. El *viewpoint*, que viene definido por los puntos de corte de la enzima de restricción que se va a utilizar durante la primera digestión, debe tener un tamaño

aproximado de entre 500 y 800 pares de bases para asegurar que la fijación de las interacciones con otras regiones con paraformaldehído es lo suficientemente eficaz.

2. La distancia entre los puntos de corte de la primera y la segunda enzima debe ser de entre 300 y 350 pares de bases para que la ligación que produce la cromatina circularizada tras el corte de la segunda enzima funcione adecuadamente.

3. La cromatina circularizada obtenida tras las dos digestiones y ligaciones es amplificada por PCR utilizando dos cebadores o *primers*. Éstos se denominan *primer* de lectura y de no lectura ya que el primero es el que se utiliza para la secuenciación. El *primer* de lectura se diseña sobre el corte de la primera enzima que queda lo más alejado posible del corte de la segunda enzima y el *de no lectura* como máximo unos 100 pares de bases del mismo.

La relación de cebadores con sus respectivas secuencias y coordenadas del *viewpoint* se encuentra en la Tabla 11. Para su diseño se utilizó el programa primer3 v.0.4.0^{134,135} seleccionando las parejas de *primers* con menor diferencia de temperatura de hibridación (T_m) y un contenido de GC entre el 60 y el 40%. También se revisó que los *primers* alineasen con el menor número posible de regiones en el genoma para lo que se usó la herramienta *Blast* del Ensembl Genome Browser (<https://www.ensembl.org/Multi/Tools/Blast>). El genoma de referencia utilizado para todos los estudios y análisis de esta tesis fue el GRCh37 (hg19).

Tabla 11.

Primers de los Viewpoints utilizados en el experimento 4C

Nombre del *primer*, secuencia y coordenadas de cada *viewpoint* que se mandó a secuenciar. Aquellos que llevan asterisco no funcionaron en la secuenciación.

Estos *primers* llevaron la secuencia para los adaptadores de Illumina: AATGATACGGCGACCACCGAAGCTCTTTCCTACACGACGCTCTTCCGATCT para los *primers* de lectura y CAAGCAGAAGACGGCATACGA para los *primers* de no lectura.

PRIMER	SECUENCIA 5'-3'	POSICIÓN
HVP1_outtad5_DPNII_R	AGGCATGAGCTCCTAGATC	Chr9: 4927232-4927824*
HVP1_outtad5_DPNII_NR	CTGCTTTGCTCTTTACCG	-
HVP2_prejak2_DPNII_R	TGTTCCAATGGAATTTGATC	Chr9: 4939062-4939694
HVP2_prejak2_Csp6I_NR	CCTTGGACCTGAACTTCC	-
HVP3_preprojak2_DPNII_R	TCTGT'TTTGCTATCTTTTAT'TGATC	Chr9: 4971002-4971685
HVP3_preprojak2_Csp6I_NR	TGAAAGGACCAAGAACATGTAC	-
HVP4_projak2_DPNII_R	CGCTCTGGTCGCCCGATC	Chr9: 4984041-4985616
HVP4_projak2_CsP6I_NR	CGCACACTTCTCCGCTTTTCG	-
HVP5_insl6_DPNII_R	GACT'TTTTCAGCAGAAAAAAGATC	Chr9: 5191827-5193155
HVP5_insl6_CsP6I_NR	GGAACCTTTGTTGCTCATTG	-
HVP6_outtad3_DPNII_R	CTGAGCCAGT'TAACCATTTAGATC	Chr9: 5267466-5268433
HVP6_outtad3_CsP6I_NR	GAACAACCTGGGAATGTGAAGTAC	-
HVP7_REGIONC1_DPNII_R	AGCTCGTAGTGTGCCGATC	Chr9: 5094457-5095792*
HVP7_REGIONC1_CSP6I_NR	CTGCAAGTTCATTTGCCCTC	-
HVP8_REGIONC4_DPNII_R	T'TAGGGATAT'TATTATAAGGGATC	Chr9: 5099762-5100805
HVP8_REGIONC4_CSP6I_NR	CAATAGCAT'TAGCTGTGCAA	-
HVP9_REGIONA_DPNII_R	TGGGGGCCTCCAGGATC	Chr9: 5042572-5044736*
HVP9_REGIONA_CSP6I_NR	GGTCAGCTTGAGGCAGTGC	-
HVP10_REGION3.1_DPNII_R	GTTGCAGGCTTCTAT'TATTAGATC	Chr9: 5109331-5111929
HVP10_REGION3.1_CSP6I_NR	CCACAAATACTGTCATATACCAAC	-
HV11_SMARCAH_DPNII_R	GCTAGGACATAAAATGAAGGGATC	Chr9: 2031596-2032558
HV11_SMARCAH_CSP6I_NR	GCTTCATTGCCCAAT'TCTGG	-
HVP12_SMARCAH_DPNII_R	AACAAGCCACAGCCTTGATC	Chr9: 2015089-2015764
HVP12_SMARCAH_CSP6I_NR	GTGCTGGCTGAATCTCTTCC	-

12.2 Obtención de muestras y cromatina circularizada

Cada experimento 4C-seq se realizó a partir de 10 millones de neutrófilos obtenidos de 4 donantes sanos (2 homocigotos para el haplotipo normal y 2 homocigotos para el haplotipo 46/1). Para ello se genotiparon 50 donantes sanos. Los neutrófilos se obtuvieron a partir de un ficoll de 20ml de sangre periférica como se ha descrito previamente.

El 4C-seq se realizó siguiendo protocolos anteriormente publicados. Los neutrófilos de cada donante se fijaron con paraformaldehído (PFA) al 2%. Una vez la cromatina estuvo fijada las células se lisaron utilizando la siguiente solución de lisado (50mM Tris-HCl pH7.5, 150 mM NaCl, 5 mM EDTA, 0.5% NP-40, 1% TX-100 y 1x Inhibidor de Proteasas, Roche). Tras este paso, se llevó a cabo la primera digestión con la enzima de restricción DpnII (New England Biolabs) que corta la secuencia GATC que define los *viewpoints* de todos los experimentos 4C-seq realizados en esta tesis doctoral. Tras esto se llevó a cabo la primera ligación (DNA ligasa T4, Promega) lo que permitió deshacer las uniones fijadas con PFA. Posteriormente se realizó la segunda digestión con la enzima Csp6I que reconoce y corta la secuencia GTAC (ThermoFisher Scientific) tras lo cual se obtuvo el material definitivo circularizado mediante una última ligación. Finalmente, el ‘molde’ 4C a partir del cual se realizó la amplificación y secuenciación fue purificado (PCR purification kit QIAquick de Qiagen) y posteriormente cuantificado por espectrofotometría en un NanoDrop (ThermoFisher Scientific).

12.3 Preparación de las Librerías

Antes de realizar la PCR inversa final se confirmó que los *primers* diseñados funcionasen. Para ello se realizó primero una PCR usando los cebadores sin los adaptadores

Illumina con distintas cantidades de DNA (12,5ng; 25ng; 50ng y 100ng) usando la Expand Long Template Polymerase Enzyme de Roche. Las condiciones de la PCR fueron las descritas previamente¹²⁸. Una vez se confirmó que los *primers* cortos funcionaban se testaron los *primers* largos, esto es con los adaptadores de Illumina para poder realizar la secuenciación (el P5 para el *primer* de lectura y el P7 para el *primer de no lectura*). Tras esto se llevó a cabo la PCR final a partir de los ‘moldes’ 4C. Para cada *viewpoint* y muestra (2 homocigotos para el haplotipo normal y 2 para el haplotipo 46/1) se preparó un *mix* de reacción para 500ng de DNA circularizado repartiéndose la reacción en 16 tubos que posteriormente fueron juntados y purificados primero con el High Pure PCT Product Purification Kit de Roche y posteriormente con bolas (*beads*) magnéticas para retirar los *primers* y fragmentos pequeños (Agencourt AMPure Kit). Antes de llevar a cabo la secuenciación se confirmó la pureza y concentración de cada muestra usando Qubit® (Qubit® dsDNA HS Assay kit for 100 Assays, 0.2-100ng (Invitrogen) en un fluorómetro Qubit® 2.0).

12.4 Secuenciación de las Librerías

Las librerías fueron normalizadas a una concentración de 10nM usando una solución Tris-Cl 10mM, pH8.5 con de 0.1% Tween 20. La secuenciación se llevó a cabo en un secuenciador Illumina HiSeq 2500 utilizando una *flow cell* HiSeq SR Cluster Kit v4 cBot y secuenciando lecturas de 50 pares de bases usando el HiSeq SBS Kit v4 de Illumina. Las lecturas se procesaron usando el paquete CASAVA (Illumina) para producir los archivos fastq.

12.5 Análisis de datos del 4C-seq

12.5.1 Normalización de Lecturas

Las lecturas del 4C-seq fueron mapeadas contra el Genoma Humano versión GRCh37 (hg19) utilizando el programa Bowtie-1.1.2¹³⁶ permitiendo un máximo de tres discordancias entre cada el fragmento secuenciado y la secuencia correspondiente del genoma. Las lecturas localizadas en fragmentos flanqueadas por dos lugares de restricción de la misma enzima, en fragmentos de 40 pares de bases o menos o alrededor de 10 kilobases del *viewpoint* se sacaron del análisis. Las lecturas mapeadas fueron posteriormente convertidas en lecturas por corte de la primera enzima y suavizadas a una media de 30 fragmentos usando un algoritmo de ventana corrida (*running window*). Los valores suavizados de cada experimento fueron finalmente normalizados por el número total de lecturas de cada experimento antes de la visualización a 1-2Mb alrededor de cada *viewpoint*.

12.5.2 Estimación Estadística de las Interacciones

Los archivos Fastq fueron demultiplexeados usando Cutadapt usando como índices las secuencias de los *viewpoints*. Para eliminar posibles contaminantes se retiró la secuencia de los adaptadores Illumina de extremo 3' y el del *viewpoint* del extremo 5' aunque conservando el sitio de restricción de la enzima. También se eliminó la secuencia cercana al punto del segundo corte del extremo 3' dejando solamente las secuencias con un mínimo de 18 nucleótidos de longitud. Esto se hizo para evitar lecturas quiméricas derivadas de pequeños fragmentos genómicos ligados.

Para hacer la estimación de los contactos, el genoma de referencia (GRCh37) fue cortado virtualmente con la primera y segunda enzimas de restricción. Posteriormente las lecturas procesadas fueron asignadas a su fragmento (cortado por la primera enzima) correspondiente eliminando las lecturas situadas en las 5kb alrededor del *viewpoint*. La cuantificación se realizó considerando cada final de fragmento (*fragment end*) como una interacción capturada si una o más secuencias mapeaban con él. El número de sitios capturados fue sumado cada 30 fragmentos por ventana (máximo 60 interacciones por ventana). La frecuencia de interacciones capturadas por ventana se usó para ajustar una función monótona decreciente con la distancia al *viewpoint*. Los Z-scores fueron calculados usando una versión modificada de FourCseq. Los contactos fueron considerados significativos cuando el Z-score fue >2 en ambas replicas y desviados de manera significativa (con un valor de $p < 0.05$ ajustado) de su distribución acumulada en al menos uno de las replicas.

Finalmente, el análisis de las lecturas procesadas y las distintas interacciones se visualizó en el WhashU EpiGenome Browser Human Genome (hg19).

I3. MODELADO 3D DE LA CROMATINA A PARTIR DE DATOS DEL 4C-SEQ: 4CIN

Como se ha comentado previamente, el 4C-seq solamente permite estudiar las interacciones de una región concreta con el resto del genoma, precisándose de otras técnicas como el Hi-C para poder estudiar las interacciones a lo largo de todo el genoma. Nuestros colaboradores del grupo de José Luis Gómez-Skarmeta, del Centro Andaluz de Biología del Desarrollo de Sevilla han desarrollado un método bioinformático, 4Cin, que permite agrupar datos de distintos 4C y crear un *heatmap* similar al de los experimentos Hi-C (*virtual Hi-C*) con el cual generar modelos 3D de la estructura de la cromatina y obtener aún más información de una serie de experimentos 4C-seq. De una manera muy simplificada (para mayor concreción revisar literatura^{137,138}), el método 4Cin modela la cromatina como si fuera una cadena de cuentas o bolitas de distintos tamaños representando un número de fragmentos de restricción. La posición de esas cuentas se optimiza asumiendo que a mayor número de lecturas o interacciones hay una menor distancia en el espacio tridimensional. Esta optimización se realiza en el software IMP¹³⁹ generándose miles de modelos que posteriormente se juntan. Finalmente, se extrae un modelo consenso que permite generar *heatmaps* y el modelo tridimensional final.

14. ESTADÍSTICA

El análisis estadístico del perfil mutacional y variables clínicas se realizó con el paquete estadístico SPSS versión 26 (SPSS Inc). Las comparaciones entre variables cualitativas y cuantitativas se realizaron mediante t-Student para muestras independientes. Las comparaciones entre variables cualitativas se realizaron con tablas de contingencia y el estadístico Chi-cuadrado o el test exacto de Fisher cuando fue necesario. Para el cálculo de curvas de supervivencia se utilizó el método de Kaplan-Meier y el test de log-rank para su comparación. Los resultados para supervivencia global, libre de progresión, libre de trombosis y libre de evento se expresan en mediana de supervivencia. El análisis multivariante se realizó mediante regresión logística para las asociaciones, usándose el modelo de riesgos proporcionales de Cox para el análisis multivariante de la supervivencia. Se consideró estadísticamente significativo un $p < 0.05$.

Para el análisis de los datos experimentales y generación de figuras se utilizó el programa GraphPad PRISM 8.4.3. Se utilizó la prueba de t-Student para muestras independientes. Los datos de los estudios de luciferasa se normalizaron con la ratio de las células transfectadas con TPOR WT. Para el análisis de las RT-qPCR se utilizó el método del $2^{-\Delta\Delta CT}$.

Para los datos de RNA-seq del PESA, se utilizó un modelo de efectos mixtos para intentar identificar genes con cambio de expresión en función del haplotipo y posteriormente se corrigieron los p-valores por comparaciones múltiples. Se realizó un análisis de enriquecimiento de genes utilizando la herramienta Enrichr (<https://amp.pharm.mssm.edu/Enrichr/>). Se utilizó el Human Gene Atlas para estudiar a qué tipos celulares se correspondía dicho enriquecimiento. Para las comparaciones entre factores de riesgo cardiovascular tradicionales se utilizaron el test de Chi-cuadrado o el exacto de Fisher en caso de ser necesario. Las variables cuantitativas se estudiaron utilizando regresión lineal.

RESULTADOS

I. UTILIDAD DE UN PANEL NGS DE GENES IMPLICADOS EN PATOLOGÍA MIELOIDE EN EL DIAGNÓSTICO Y PRONÓSTICO DE LAS NEOPLASIAS MIELOPROLIFERATIVAS

Con el objetivo de evaluar la utilidad del estudio de un panel de genes implicados en patología mieloide para el diagnóstico, pronóstico y estudio de la biología de las NMP se recogieron datos de 140 pacientes cuyas características se encuentran resumidas en el apartado Materiales y Métodos de esta tesis (Tabla 6).

I.1 El perfil mutacional y su interpretación ayuda a discriminar entre pacientes con y sin patología mieloide

De todos los pacientes a los que se le secuenció el panel mieloide, un 23.6% (33) tuvieron un diagnóstico final de benignidad. Los pacientes con diagnóstico final de benignidad presentaron mayor cifra de hemoglobina al diagnóstico que aquellos con NMP (15.8 vs 13.32, $p=0.01$) mientras que no se encontraron diferencias en las cifras de leucocitos ($p=0.559$) o plaquetas ($p=0.057$). Estas diferencias en los niveles de hemoglobina pueden deberse tanto a los pacientes que se secuenciaron con sospecha de poliglobulia familiar como a los pacientes con MFP, que se presentan frecuentemente con anemia.

En cualquier caso, debido a que se obtuvieron datos de hemograma al diagnóstico en menos de la mitad de los pacientes, no se hicieron más análisis a este respecto. El resto de características de los pacientes y su perfil mutacional están resumidas en la Tabla 12.

Tabla 12.

Características, evolución clínica y perfil mutacional de los pacientes secuenciados con y sin patología mieloide

		SIN PATOLOGÍA (33)	PATOLOGÍA MIELOIDE (101)	P
Sexo (n)	Varón	60.6% (20)	49% (50)	0.335
	Mujer	39.4% (13)	52% (51)	
Edad al Diagnóstico	Años, mediana (rango)	54.06 (24.47-84.06)	56.5 (1.26-83.38)	0.952
Motivo de Petición (n)	Búsqueda de Clonalidad	81.8% (27)	43.1% (44)	p< 0.001
	Definición diagnóstica	16.1% (6)	15.7% (16)	
	Pronóstico	0% (0)	19.6% (20)	
	Progresión	0% (0)	21.6% (22)	
Mutaciones detectadas por el panel (n)	Sí	54.5% (18)	87.3% (89)	< 0.001
	No	45.5% (15)	12.7% (13)	
	Mutaciones con Significado Clínico	15.1% (5)	78.22% (79)	< 0.001
	Mutaciones de Significado Incierto	45.5% (15)	21.8% (22)	
Número de mutaciones	Mediana (rango)	1 (0-5)	2 (0-7)	< 0.001
Vías Mutadas (n)	Tirosinas cinasas y sus rutas	21.2% (7)	69.3% (70)	0.001
	Factores de transcripción	24.2% (8)	19.8% (20)	0.625
	Supresores de tumor	0% (0)	8.9% (9)	0.112
	Modificadores epigenéticos	12.1% (4)	42.6% (43)	< 0.001
	Factores de splicing	6.1% (2)	22.8% (23)	0.039
	Cohesinas y otros	3% (1)	3% (3)	1
	DAT	6.1% (2)	33.7% (34)	0.001
Características y Evolución Clínica (n)	Factores de riesgo cardiovascular	30.3% (10)	46.3% (37)	0.814
	Trombosis	3% (1)	7.9% (6)	1
	Hemorragia	0% (0)	4.1% (3)	1
	Exitus	0% (0)	12.5% (11)	0.12

Si comparamos la presencia o no de mutaciones entre los pacientes sin patología mielode y aquellos con diagnóstico patológico (TE, PV, MFP, SMD/NPMC y otras patologías mieloides) se observa una asociación entre presentar mutaciones y padecer alguna patología mielode (OR 8.22 (3.34-20.19), $p < 0.001$). Esta asociación es a expensas de mutaciones con utilidad clínica (OR 20.11 (6.95-58.18) $p < 0.001$) y en genes de tirosinas cinasas, modificadores epigenéticos y aquellos implicados en splicing (OR 8.39 (3.29-21.38), $p < 0.001$, OR 5.38 (1.76-16.43), $p = 0.001$ y OR 4.57 (1.02-20.56), $p = 0.039$ respectivamente). Individualmente, los genes estadísticamente significativos fueron CALR (OR 6.47 (0.83-50.69) $p = 0.044$), JAK2 (OR 6,56 (1.87-22.93), $p = 0.01$), TET2 (OR 8.91 (1.15-68.93), $p = 0.015$) y a la presencia de mutaciones en genes DNMT3A, ASXL1 y TET2, OR 7.87 (1.78-34.84), $p = 0.001$). En el estudio multivariante por regresión logística solamente la presencia de mutaciones con utilidad clínica (OR=19.39 (5.13-73.27) $p < 0.001$) se asoció a presentar patología.

1.2 Características de los pacientes con Neoplasias Mieloproliferativas Clásicas

Posteriormente, y antes de analizar el papel pronóstico de su perfil mutacional, estudiamos las características de los pacientes con NMP clásicas. De la serie global, 82 (58.7%) pacientes presentaban diagnóstico de NMP clásica, es decir, TE, PV o MFP. Como veremos más adelante 4 pacientes (un 2.8%) presentaban diagnóstico de Trombocitosis Familiar y se sacaron de este subanálisis.

Como puede observarse en la Tabla 13, que resume las características clínicas y perfil mutacional del conjunto de NMP clásicas, los motivos de petición difieren entre unas entidades y otras, destacando la búsqueda de clonalidad en el caso de las TE y el estudio

de factores pronósticos en el caso de las MFP. Destacan también las diferencias en las cifras de positividad para mutaciones en JAK2 entre las distintas entidades, algo claramente relacionado con los motivos de petición, más dirigidos al diagnóstico en el caso de las TE y PV. Aunque sin diferencias estadísticamente significativas las TE presentaron 1.92 mutaciones de media, las PV 2.1 y las MFP 2.68 mutaciones, lo que va en línea con un mayor número de mutaciones en MFP^{14,140}. Respecto a las diferencias en el porcentaje de pacientes con progresión, mucho menores en MFP, esto se debe a la progresión a mielofibrosis secundaria de TE y PV.

Tabla 13.

Características, evolución clínica y perfil mutacional de los pacientes con neoplasias mieloproliferativas clásicas a los que se realizó panel mieoide

En negrita se encuentran las variables con diferencias estadísticamente significativas entre TE, PV y MFP.

		NMP (82)	TE (49)	PV (11)	MFP (22)	P
Sexo (n)	Varón	46.3% (38)	34.7% (17)	54.5% (6)	68.2% (15)	0.027
	Mujer	53.7% (44)	65.3% (32)	45.5% (5)	31.8% (7)	
Edad al Diagnóstico	Años, mediana (rango)	55.0 (1.26-83.38)	50.53 (15.26-83.38)	47.95 (23.16-76.94)	64.0 (1.26-80.21)	0.437
Motivo de Petición (n)	Búsqueda de Clonalidad	39% (32)	49% (24)	36.4% (4)	18.2% (4)	0.01
	Definición diagnóstica	13.4% (11)	12.2% (6)	18.2% (2)	13.6% (3)	
	Pronóstico	22% (18)	12.2% (6)	0% (0)	54.5% (12)	
	Progresión	25.6% (21)	26.5% (13)	45.5% (5)	13.6% (3)	
Citogenética alterada	Sí	14.3% (4)	5.3% (1)	33.3% (1)	33.3% (2)	0.140
	Sí	85.4% (69)	79.6% (39)	90% (9)	95.5% (21)	0.085
	No	14.6% (12)	20.4% (10)	10% (10)	4.5% (1)	
Mutaciones detectadas por el panel (n)	Mutaciones con Significado Clínico	74.4% (60)	65.3% (32)	80% (8)	89.9% (20)	0.068
	Mutaciones de Significado Incierto	52.4% (42)	55.1% (27)	50% (5)	45.5% (10)	0.748
Número de mutaciones	Mediana (rango)	2 (0-7)	2 (0-7)	2 (0-5)	2 (0-7)	0.225

		NMP (82)	TE (49)	PV (11)	MFP (22)	P
Genes Mutados (n)	ASXL1	16% (13)	10.2% (5)	10% (1)	31.8% (7)	0.062
	BCOR	2.5% (2)	2% (1)	10% (1)	0% (0)	0.229
	BCORL1	3.7% (3)	4.1% (2)	0% (0)	4.5% (1)	0.799
	CALR	19.8% (16)	22.4% (11)	10% (1)	18.2% (4)	0.651
	CBL	4.9% (4)	2% (1)	10% (1)	9.1% (2)	0.328
	CEBPA	0% (0)	0% (0)	0% (0)	0% (0)	-
	CSF3R	4.9% (4)	4.1% (2)	0% (0)	9.1% (2)	0.496
	DNMT3A	4.9% (4)	4.1% (2)	20% (2)	0% (0)	0.049
	EGLN1	0% (0)	0% (0)	0% (0)	0% (0)	-
	EPAS1	0% (0)	0% (0)	0% (0)	0% (0)	-
	EPOR	4.9% (4)	4.1% (2)	10% (1)	4.5% (1)	0.730
	ETV6	6.2% (5)	8.2% (4)	0% (0)	4.5% (1)	0.579
	EZH2	4.9% (4)	6.1% (3)	0% (0)	4.5% (1)	0.714
	FLT3	2.5% (2)	0% (0)	0% (0)	9.1% (2)	0.064
	IDH1	3.7% (3)	6.1 (3)	0% (0)	0% (0)	0.362
	IDH2	0% (0)	0% (0)	0% (0)	0% (0)	-
	JAK2	40.7% (33)	28.6% (14)	70% (7)	54.5% (12)	0.016
	KDM6A	2.5% (2)	4.1% (2)	0% (0)	0% (0)	0.512
	KIT	3.7% (3)	0% (0)	0% (0)	13.6% (3)	0.015
	KMT2A	3.7% (3)	4.1% (2)	0% (0)	4.5% (1)	0.799
	KRAS	1.2% (1)	2% (1)	0% (0)	0% (0)	0.718
	MPL	4.9% (4)	6.1% (3)	0% (0)	4.5% (1)	0.714
	NF1	3.7% (3)	4.1% (2)	0% (0)	4.5% (1)	0.799
	NPM1	0% (0)	0% (0)	0% (0)	0% (0)	-
	NRAS	3.7% (3)	2% (1)	10% (1)	4.5% (1)	0.464
	PHF6	1.2% (1)	0% (0)	0% (0)	4.5% (1)	0.257
	PRPF40B	3.7% (3)	2% (2)	10% (1)	0% (0)	0.464
	RAD21	0% (0)	0% (0)	0% (0)	0% (0)	-
	RUNX1	2.5% (2)	0 % (0)	0% (0)	9.1% (2)	0.064
	SETBP1	0% (0)	0% (0)	0% (0)	0% (0)	-
	SF3A1	1.2% (1)	2% (1)	0% (0)	0% (0)	0.718
	SF3B1	2.5% (2)	4.1% (2)	0% (0)	0% (0)	0.512
	SH2B3	4.9% (4)	6.1% (3)	10% (1)	0% (0)	0.400
	SMC1A	0% (0)	0% (0)	0% (0)	0% (0)	-
	SRSF2	2.5% (2)	0% (0)	0% (0)	9.1% (2)	0.064
	STAG2	0% (0)	0% (0)	0% (0)	0% (0)	-
	TET2	17.3% (14)	14.3% (7)	30% (3)	18.2% (4)	0.484
	THPO	1.2% (1)	2% (1)	0% (0)	0% (0)	718
	TP53	6.2% (5)	4.1% (2)	0% (0)	13.6% (3)	0.208
	U2AF1	9.9% (8)	6.1% (3)	0% (0)	22.7% (5)	0.051

		NMP (82)	TE (49)	PV (11)	MFP (22)	P
Genes Mutados (n)	VHL	0% (0)	0% (0)	0% (0)	0% (0)	-
	WT1	1.2% (1)	2% (1)	0% (0)	0% (0)	0.718
	ZRSR2	2.5% (2)	4.1% (2)	0% (0)	0% (0)	0.512
Vías Mutadas (n)	Tirosinas cinasas y sus rutas	70.4% (57)	62.1% (30)	80% (8)	86.4% (19)	0.078
	Factores de transcripción	17.3% (14)	18.4% (9)	0%	22.7% (5)	0.274
	Supresores de tumor	11.1% (9)	10.2% (5)	0% (0)	18.2% (4)	0.301
	Modificadores epigenéticos	39.5% (32)	32.7% (16)	70% (7)	40.9% (9)	0.088
	Factores de splicing	18.5% (15)	14.3% (7)	10% (1)	31.8% (7)	0.162
	Cohesinas y otros	2.5% (2)	2% (1)	10% (1)	4.5% (1)	0.464
	DAT	32.1% (26)	22.4% (11)	60% (6)	40.9% (9)	0.04
Características y Evolución Clínica (n)	Factores de riesgo cardiovascular	47.9 (34%)	40% (18)	70% (7)	56.3% (9)	0.171
	Trombosis	6% (4)	4.5% (2)	20% (2)	0% (0)	0.106
	Hemorragia	3% (3)	4.8% (2)	10% (1)	0% (0)	0.421
	Transformación a PV	0% (0)	0% (0)	NA	0% (0)	-
	Progresión a MF	38.6% (22)	35.7% (15)	70% (7)	NA	0.075
	Progresión a SMD	3% (2)	4.7% (2)	9.1% (1)	0% (0)	0.576
	Progresión a LMA	6.2% (4)	4.8% (2)	9.1% (1)	9.1% (2)	0.257
	Progresión	30.5% (25)	32.7% (16)	63.6% (7)	9.1% (2)	0.005
	Evento (Trombosis o Progresión)	31.7% (26)	32.7% (16)	72.7% (8)	9.1% (2)	0.001
	Exitus	10.5% (8)	6.4% (3)	0% (0)	26.3% (5)	0.029

Aunque no es objeto de esta tesis, se analizaron también los tratamientos recibidos por los pacientes con NMP. Un 57.4% (39) recibieron hidroxycarbamida (un 67% (28) de las TE, un 70% (7) de las PV y un 25% (4) de las MFP), un 3% (2) busulfán (una TE y una PV), un 7.6% (5) interferón (5 casos TE, un 12% de las mismas), un 16.7% (11) anagrelide, (un 21% (9) de las TE y un 20% (2) de las PV). Recibieron ruxolitinib un 28.8% (19) de los pacientes (un 19% (8) de las TE (eran casos que se transformaron), un 30% (3) de las PV y un 57% (8) de las MFP). Un 71.6% (48) recibieron antiagregación

y un 11.9% (8) anticoagulación. Solamente un paciente con MFP recibió trasplante alogénico.

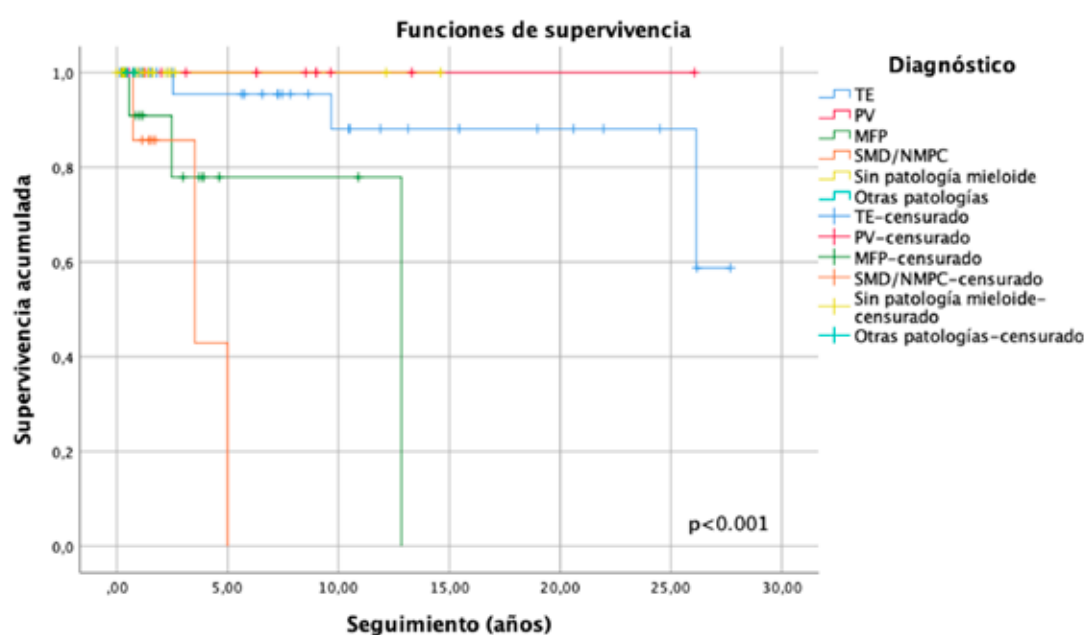
Tras realizar el descriptivo de nuestra serie de NMP procedimos a estudiar el valor pronóstico del perfil mutacional en estas entidades.

I.3 Efecto del perfil mutacional en la Mortalidad y Supervivencia Global de las Neoplasias Mieloproliferativas Clásicas

Con una mediana de seguimiento desde el diagnóstico de 1.9 años (rango de 0-27.69), no se observaron exitus ni en pacientes sin diagnóstico de neoplasia mieloide ni en pacientes con diagnóstico de PV. Por tanto, se observaron diferencias ($p < 0.001$) en supervivencia entre los distintos grupos diagnósticos a expensas de los pacientes con TE (mediana de supervivencia de 24.77 (21.53-28.0) años), MFP (10.37 (6.63-14.11) años) y SMD/NMP (3.75 (2.2-5.3) años) (Figura 8). La mediana de seguimiento tan corta en relación al rango se debe a que gran parte de los estudios se realizaron al diagnóstico.

Figura 8.

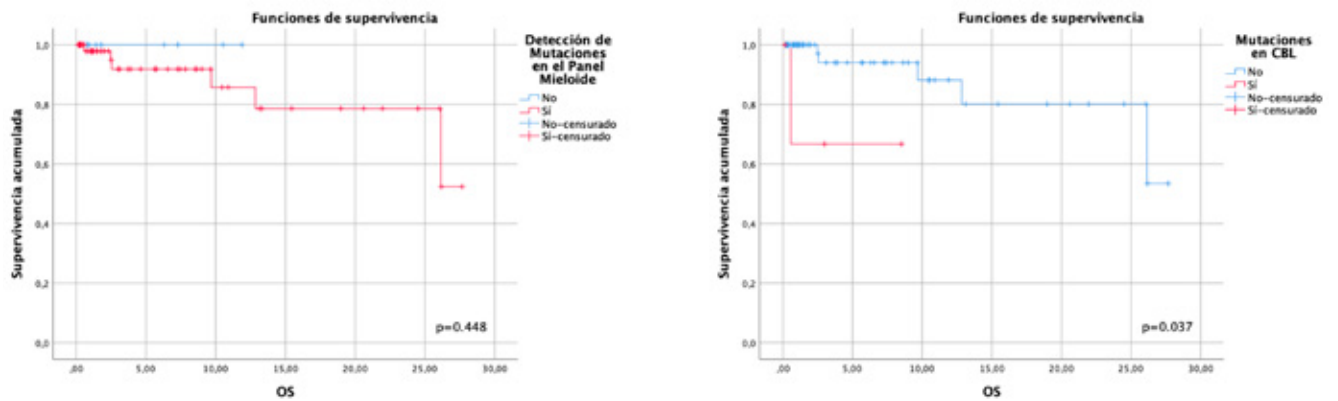
Supervivencia global en función del diagnóstico del paciente



Respecto a las NMP clásicas, no se encontraron asociaciones significativas de la mortalidad con ningún gen ni con la presencia de mutaciones por NGS, su número o vías mutadas. Esta ausencia de asociaciones se mantuvo en el modelo multivariante por regresión logística. En cuanto a la supervivencia solamente las mutaciones en CBL presentaron menor supervivencia (23.53 vs 5.86 años $p=0.037$) aunque este hallazgo desapareció en la regresión de Cox (Figura 9).

Figura 9.

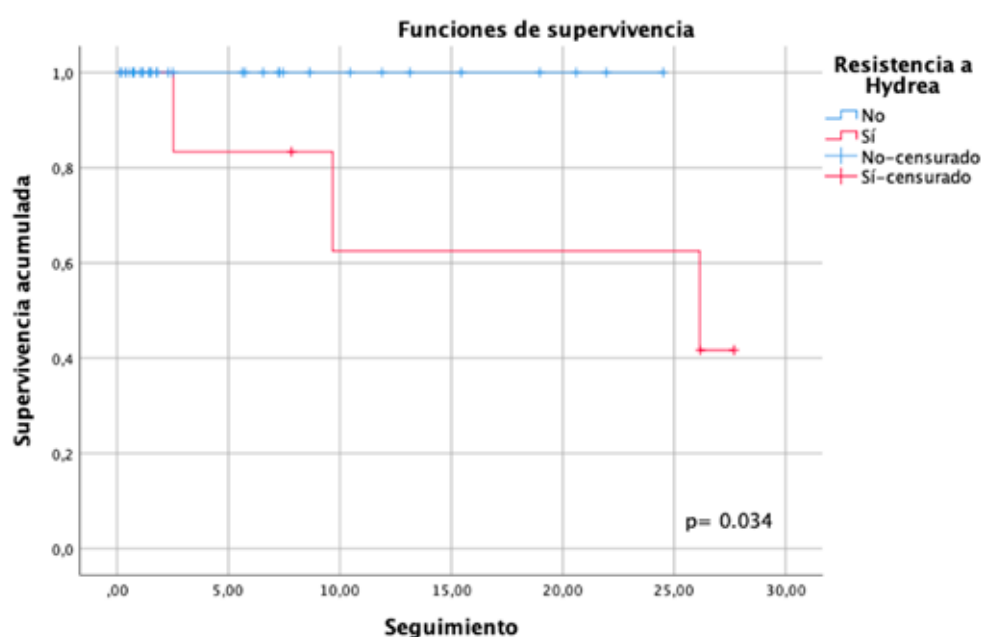
Supervivencia global en Neoplasias Mieloproliferativas Clásicas en función del perfil mutacional



Debido al bajo número de pacientes con PV (11) y MFP (22) no se pudieron identificar asociaciones relevantes en estos subgrupos. Sin embargo, la cohorte de TE, con 49 pacientes, sí permitió realizar análisis de asociación y supervivencia. A pesar de esto, en cuanto a mortalidad, no se observaron asociaciones con la presencia o no de mutaciones, su número o ningún gen en particular destacando solamente la asociación entre mortalidad y resistencia a hidroxycarbamida ($p=0.002$, todos los pacientes con TE que fallecieron presentaron resistencia a hidroxycarbamida, Figura 10). Dada la relevancia de la resistencia a hidroxycarbamida se investigó si ésta se asociaba a algún perfil mutacional. Solamente EZH2 se acercó a la significación estadística ($p=0.051$).

Figura 10.

Supervivencia Global en pacientes con TE en función de la presencia o no de resistencia a la hidroxycarbamida



1.4 Efecto del perfil mutacional en la Progresión y Supervivencia Libre de Progresión de las Neoplasias Mieloproliferativas Clásicas

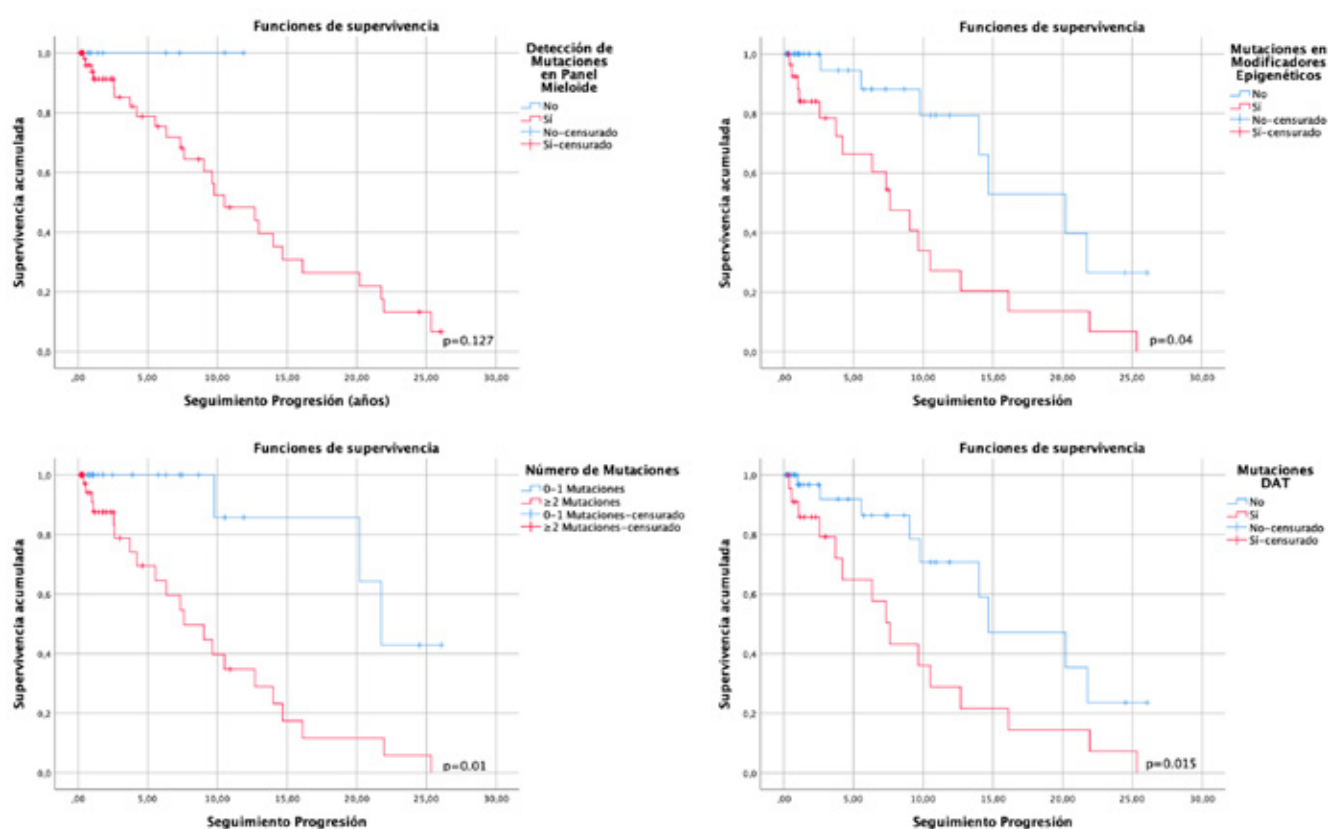
Tras estudiar el valor del perfil mutacional en la mortalidad se decidió estudiar su papel en la progresión tanto en el grupo de NMP clásicas como en el subgrupo de TE.

En cuanto a las NMP clásicas, se encontró asociación entre progresión y la presencia de mutaciones por NGS, (todos los pacientes que progresaron presentaban mutaciones, $p=0.014$), mutaciones en tirosinas cinasas y sus vías (OR 6.91 (1.48-32.34) $p= 0.007$), en genes de modificadores epigenéticos (OR 6.8 (2.36-19.62) $p<0.001$) y DAT (OR

6.97 (2.42-20) $p < 0.001$). Los genes asociados fueron ASXL1 (OR 3.5 (1.03-11.86) $p = 0.05$), CALR (OR 6.07 (1.9-19.6) $p = 0.004$) y TET2 (OR 4.25 (1.28-14.01) $p = 0.02$). La presencia de mutaciones clasificadas como con significado clínico se asoció a progresión ($p < 0.001$, todos los pacientes) al contrario que la presencia de mutaciones con significado incierto. El número de mutaciones no presentó asociación en el análisis univariante sin embargo sí en el multivariante por regresión logística (OR 3.51 (1.1-11.25), $p = 0.035$) en el que desaparecieron el resto de variables (se ajustó por sexo, edad, citogenética alterada, diagnóstico y perfil mutacional). En el análisis de tiempo a progresión, este fue menor en aquellos pacientes con mutaciones detectadas en genes modificadores epigenéticos (mediana de supervivencia libre de progresión 9.23 vs 17.6 años) y mutaciones DAT (9.3 vs 16.4 años) y en función del número de mutaciones (21.56 (0-1 mutaciones) vs 9.54 años (más de 2 mutaciones) (Figura 11). El análisis de tiempo a progresión mediante regresión de Cox no encontró asociaciones.

Figura 11.

Supervivencia Libre de Progresión en Neoplasias Mieloproliferativas Clásicas en función del perfil mutacional



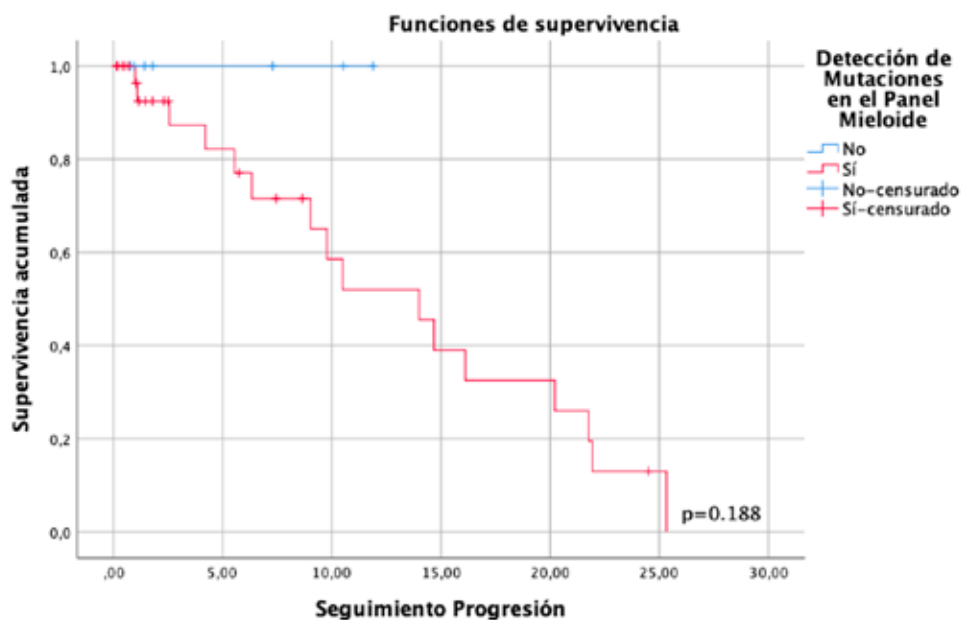
Si nos centramos en las TE, se encontró asociación entre la progresión a mielofibrosis y la presencia de mutaciones de CALR tipo I ($p < 0.001$) y la detección de mutaciones en el panel mioide ($p = 0.02$) a expensas de la identificación de mutaciones con significado clínico ($p < 0.001$, todos los pacientes que progresaron presentaban alguna de estas características). En cuanto a las vías mutadas se encontró asociación con mutaciones en tirosinas cinasas o sus vías (OR 7.44 (1.46-38.0) $p = 0.012$), modificadores epigenéticos (OR 7.5 (1.96-28.76) $p = 0.003$) y los genes DAT (OR 10 (2.15-46.61) $p = 0.003$). Los

genes específicos que se asociaron a progresión fueron ASXL1 (OR 10.67 (1.1-105.28) $p=0.034$), CALR (OR 19.93 (3.51-113.3) $p<0.001$), EZH2 ($p=0.03$) y TET2 (OR 7.05 (1.19-41.71) $p=0.03$). Entre las variables clínicas fue significativa la asociación con la presencia de resistencia a hidroxycarbamida ($p=0.02$, todos los que la presentaron progresaron). Por regresión logística estas asociaciones perdieron significación estadística. En cuanto a tiempo a la progresión no se encontraron asociaciones significativas ni en el modelo univariante ni en el multivariante por regresión de Cox (Figura 12).

Figura 12.

Supervivencia libre de progresión en TE con mutaciones vs sin ellas

Se observa clara tendencia a una menor supervivencia en aquellas TE con detección de mutaciones.



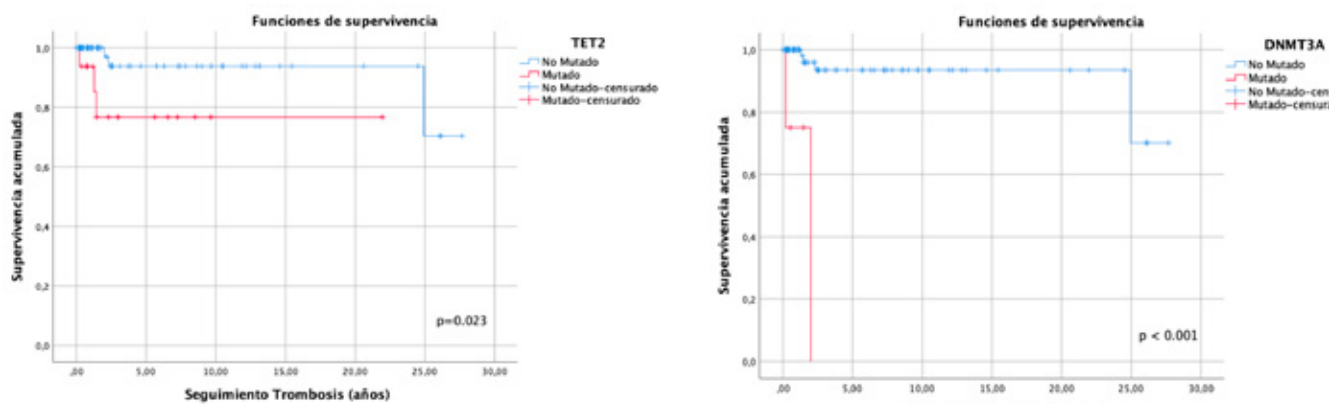
1.5 Efecto del perfil mutacional en la aparición de Trombosis y Supervivencia Libre de Trombosis

Dado que una de las principales complicaciones de las NMP es la enfermedad trombótica, decidimos estudiar el efecto del perfil mutacional en la trombosis. No estudiamos su efecto sobre las hemorragias dado que los únicos tres pacientes que presentaron clínica hemorrágica la presentaron de forma leve y explicada por otras casusas (dos pacientes equimosis y otro hematuria leve).

En la cohorte global se encontró asociación entre trombosis y la presencia de mutaciones en DAT (OR 6.15 (1.12-33.75) $p=0.032$), TET2 (OR 7.24 (1.46-35.92) $p=0.021$) y DNMT3A (OR 17.6 (2.04-152.18) $p=0.025$). Esta asociación se mantuvo en el estudio multivariante con regresión logística ajustando por edad y sexo para TET2 (OR=18.22 (1.84-180.64), $p=0.013$) y DNMT3A (OR=39.99 (2.29-699.13) $p=0.012$) a los que se añadió KNMT2A (OR=23.42 (1.15-477.25) $p=0.04$). No se observó asociación con el diagnóstico ($p=0.103$) ni con la presencia de patología mieloide ($p=1.0$) o mutaciones ($p=0.344$). Esta asociación se refleja en la supervivencia libre de trombosis (TFS) en la regresión de Cox para TET2 (HR= 14.5 (1.46-144.23), $p=0.023$) y DNMT3A (HR=67.87 (5.2-885.87) $p=0.01$). La mediana de TFS para TET2 fue de 17.1 (12.2-21) años vs 25.46 (23.14-27.8) para no mutados y la de DNMT3A 1.55 (0.48-2.62) vs 25.36 (23.24-27.47) años (Figura 13).

Figura 13.

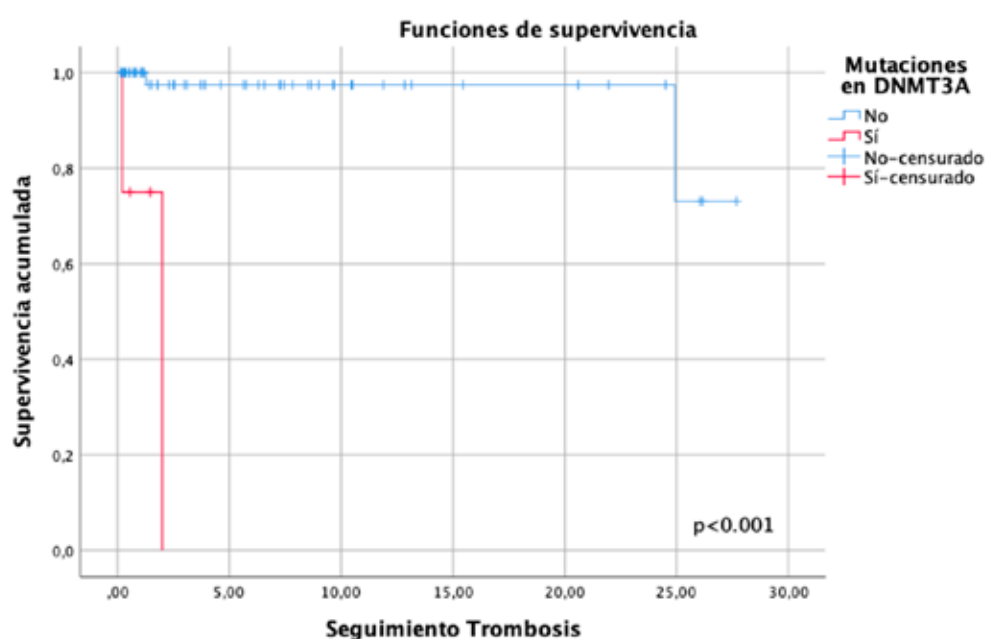
Supervivencia libre de Trombosis en la serie global función del estado mutacional de TET2 y DNMT3A



En la cohorte de NMP no se encontró asociación de trombosis con la presencia de mutaciones en DAT ($p=0.133$) aunque sí con mutaciones en DNMT3A (OR 30 (2.68-335.28) $p=0.016$). La mediana de tiempo libre de trombosis fue de 1.55 años para los DNMT3A mutados versus 26.34 para los no mutados (Figura 14). Esta asociación se perdió en regresión logística y de Cox.

Figura 14.

Supervivencia Libre de Trombosis en NMP en función de presencia o no de mutaciones en el gen DNMT3A



En el subgrupo de TE solamente las mutaciones tipo 1 de CALR ($p=0.03$) y CALR ($p=0.048$) se asociaron a Trombosis (los dos pacientes que la presentaron tenían mutaciones en CALR). Ambas perdieron significación en el análisis multivariante.

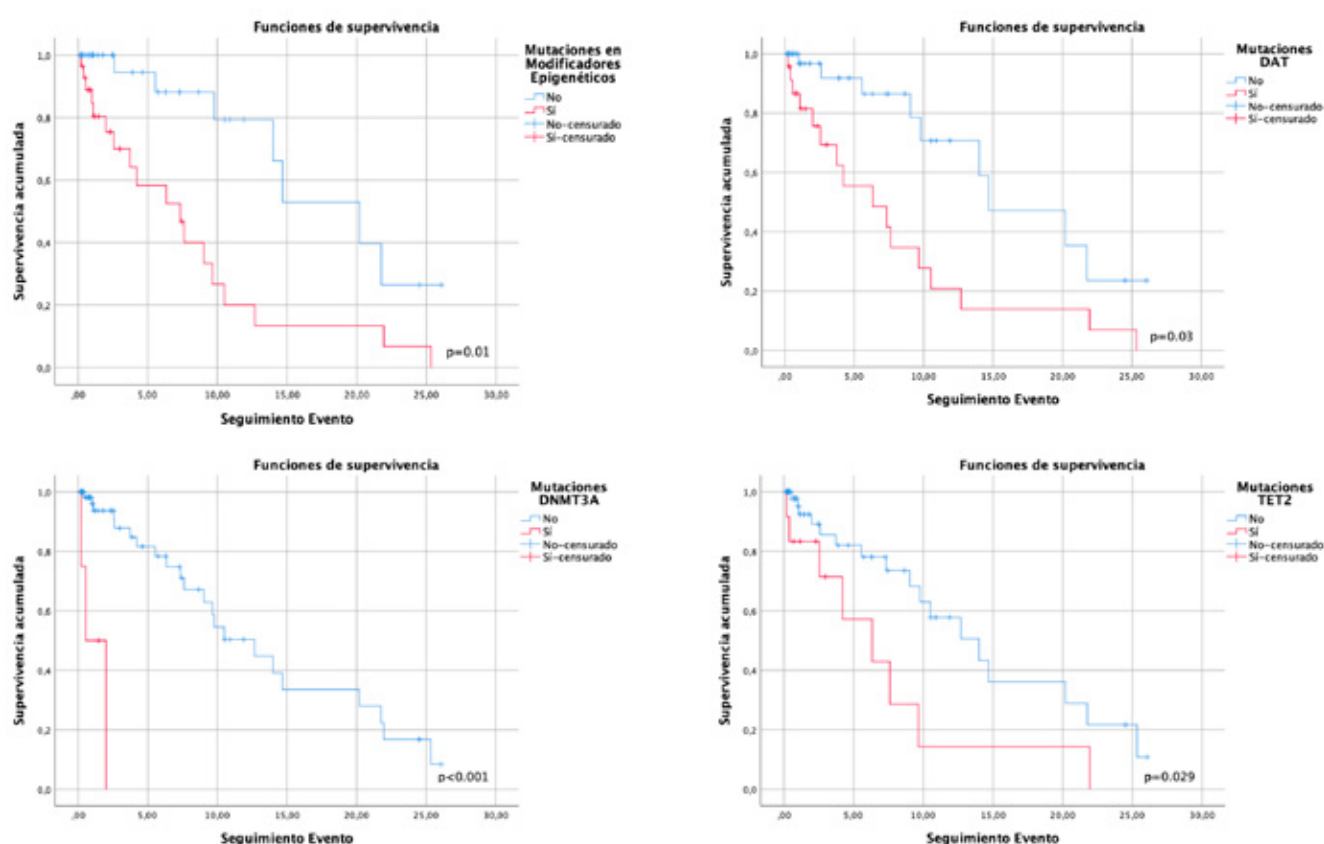
1.6 Efecto del perfil mutacional en la aparición de Eventos y Supervivencia Libre de Evento de las Neoplasias Mieloproliferativas Clásicas

Por último, estudiamos la presencia o no de evento (progresión o trombosis) en la cohorte de NMP clásicas. La detección de mutaciones ($p=0.008$, todos los pacientes), en concreto mutaciones de utilidad clínica ($p<0.001$, todos los pacientes) aumentó el riesgo.

Al igual que en progresión, la presencia de mutaciones en tirosinas cinasas (OR 7.44 (1.59-34.75) $p=0.004$) y modificadores epigenéticos (OR 7.71 (2.67-22.31) $p<0.001$) se asoció a presentar un evento, así como la presencia de mutaciones DAT (OR 8.18 (2.82 vs 23.73) $p<0.001$). En cuanto a genes individuales solamente CALR (OR 5.56 (1.73-17.81) $p=0.005$) y TET2 (OR 3.92 (1.19-12.93) $p=0.027$) presentaron asociación. En cuanto a supervivencia libre de evento, la detección de mutaciones en modificadores epigenéticos (mediana de 8.1 vs 15.6 años), en genes DAT (7.96 vs 16.41 años), en DNMT3A (1.19 vs 13.27 años) y en TET2 (7.46 vs 14 años) asoció peor supervivencia (Figura 15). En el estudio multivariante por regresión logística DAT (OR 18.67 (2.53-137.58), $p=0.004$) permanece asociado a la aparición de un evento mientras que la regresión de Cox DNMT3A aparece significativo para el tiempo en presentar un evento (HR 29.52 (3.03-287.65) $p=0.004$).

Figura 15.

Supervivencia libre de evento en Neoplasias Mieloproliferativas Clásicas en función del perfil mutacional



1.7 Estudio de pacientes con Trombocitemia Esencial Triple Negativa

De la cohorte de TE a las que se hizo panel mieloide en contexto asistencial, 31 eran TE Triples Negativas (TE-TN), definidas como aquellas sin mutación V617F de JAK2, mutaciones tipo I y II de CALR y típicas del codón 515 de MPL. Dado el interés diagnóstico y pronóstico de esta entidad se añadieron 16 pacientes de nuestro biobanco con diagnóstico de TE-TN a los que se realizó panel mieloide y de los cuales se recogieron variables clínicas. Dichas características están resumidas en la Tabla 14.

Tabla 14.

Características, evolución clínica y perfil mutacional los pacientes con TE-TN a los que se realizó panel mioleide

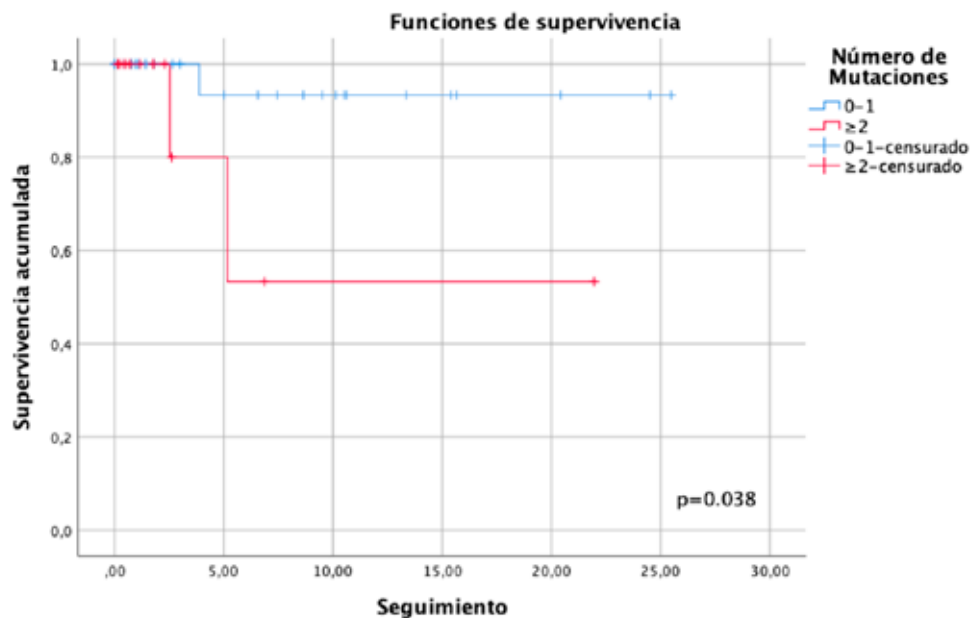
		TE-TN (47)
Sexo (n)	Varón	29.8% (14)
	Mujer	70.2% (33)
Edad al Diagnóstico	Años, mediana (rango)	53 (14-88)
Mutaciones detectadas por el panel (n)	Si	63.8% (30)
	Mutaciones en Genes driver	23.4% (11)
Número de mutaciones	Mediana (rango)	1 (0-7)
Genes Mutados (n)	ASXL1	8.5% (4)
	BCOR	0% (0)
	BCORL1	4.3% (2)
	CALR	4.3% (2)
	CBL	4.3% (2)
	CEBPA	0% (0)
	CSF3R	2.1% (1)
	DNMT3A	2.1% (1)
	EGLN1	0% (0)
	EPAS1	2.1% (1)
	EPOR	4.3% (2)
	ETV6	8.5% (4)
	EZH2	2.1% (1)
	FLT3	0% (0)
	IDH1	2.1% (1)
	IDH2	2.1% (1)
	JAK2	10.6% (5)
	KDM6A	0% (0)
	KIT	2.1% (1)
	KMT2A	6.4% (3)
	KRAS	2.1% (1)
	MPL	6.4% (3)
	NF1	2.1% (1)
	NPM1	0% (0)

		TE-TN (47)
	NRAS	0% (0)
	PHF6	0% (0)
	PRPF40B	0% (0)
	RAD21	0% (0)
	RUNX1	2.1% (1)
	SETBP1	0% (0)
	SF3A1	2.1% (1)
	SF3B1	2.1% (1)
	SH2B3	2.1% (1)
	SMC1A	0% (0)
	SRSF2	0% (0)
	STAG2	0% (0)
	TET2	12.8% (6)
	THPO	2.1% (1)
	TP53	2.1% (1)
	U2AF1	2.1% (1)
	VHL	2.1% (1)
	WT1	2.1% (1)
	ZRSR2	0% (0)
Vías Mutadas (n)	Tirosinas cinasas y sus rutas	38.3% (18)
	Factores de transcripción	14.9% (7)
	Supresores de tumor	8.5% (4)
	Modificadores epigenéticos	27.7% (13)
	Factores de splicing	6.4% (3)
	Cohesinas y otros	0% (0)
	DAT	19.1% (9)
Características y Evolución (n)	Factores de riesgo cardiovascular	37.5% (15)
	Trombosis	2.1% (1)
	Transformación a PV	0% (0)
	Progresión a MF	4.3% (2)
	Progresión a SMD	2.1% (1)
	Progresión a LMA	6.4 (3)
	Progresión	10.6% (5)
	Evento (Trombosis o Progresión)	12.8% (6)
	Exitus	7% (3)

En el estudio de mortalidad no se encontraron asociación entre mortalidad y presencia de mutaciones ($p=0.282$). Si se encontró una asociación significativa entre el número de mutaciones detectadas y la supervivencia (mediana de 24.0 años vs 13.6 años en pacientes con 0-1 o 2 o más mutaciones respectivamente, $p=0.038$, ningún paciente sin mutaciones falleció (Figura 16) aunque esta asociación se perdió en el modelo multivariante de Cox. No se encontró ninguna otra asociación con mortalidad o supervivencia.

Figura 16.

Supervivencia global Trombocitemia Esencial Triple Negativa en función del número de mutaciones

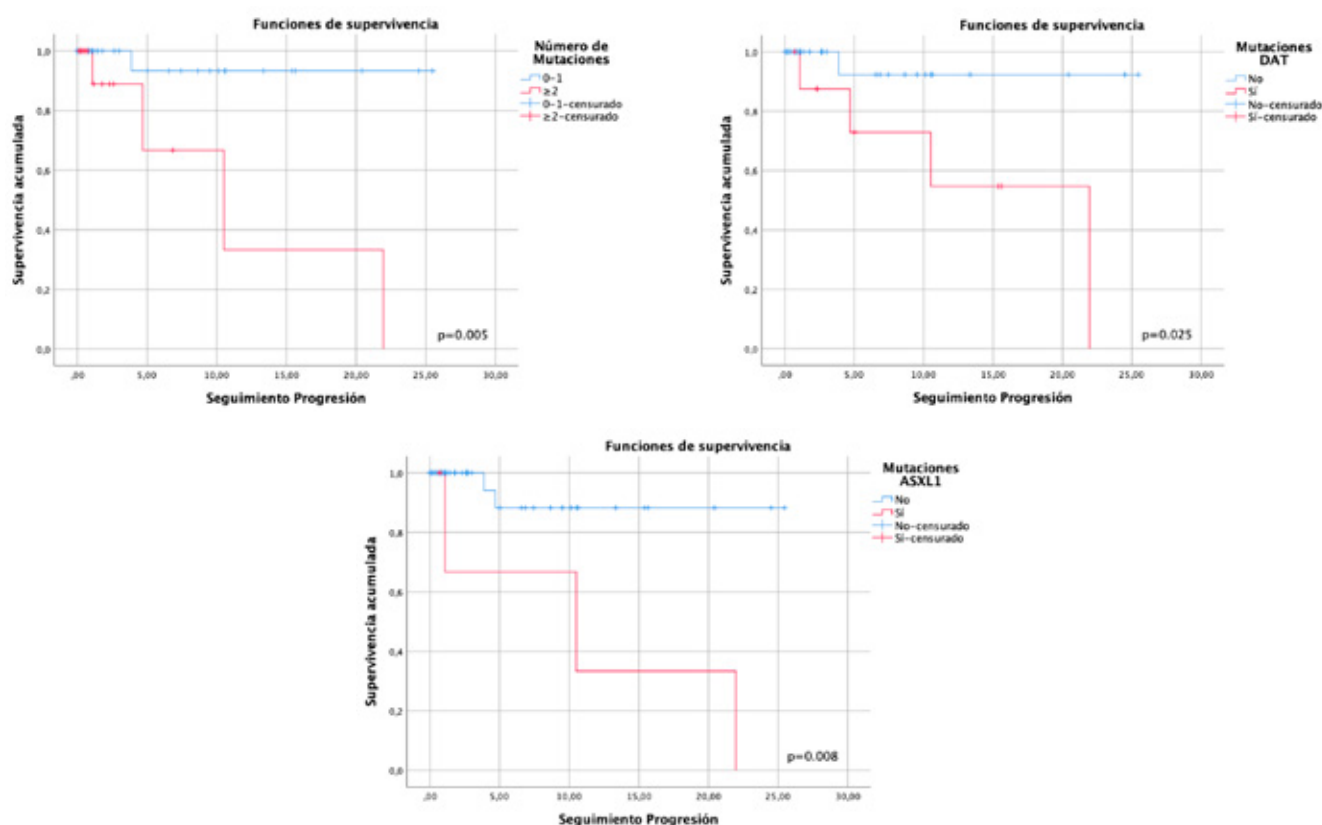


Si analizamos la progresión, las mutaciones en modificadores epigenéticos (OR 14.67 (1.45-148.0) $p=0.017$) y en los genes DAT (OR 29.6 (2.73-320.47) $p=0.003$) se asociaron a progresión. En cuanto a genes individuales solamente ASXL1 (OR 61.5 (4.25-

889.3) $p=0.002$) presentó asociación. Haber recibido anagrelide también se asoció a riesgo de progresión (OR 24.0 (2.43-236.89) $p=0.01$). En estudio multivariante mediante regresión logística solamente ASXL1 mantuvo asociación ($p=0.03$) con progresión. En cuanto tiempo a progresión el número de mutaciones fue significativo (mediana de 24.04 años para 0-1 mutaciones vs 11.98 para aquellos con 2 o más, $p=0.005$, ningún paciente sin mutaciones progresó). Además, la presencia de mutaciones DAT (14.74 vs 23.82 años, $p=0.025$) y mutaciones en ASXL1 (11.18 vs 22.99 años $p=0.008$) también presentaron asociación significativa con progresión (Figura 17). No se encontraron asociaciones en el modelo de Cox.

Figura 17.

Supervivencia libre de Progresión en Trombocitemia Esencial Triple Negativa en función del perfil mutacional



Solamente un paciente presentó trombosis por lo que no se hizo análisis a este respecto ni se buscaron asociaciones con presentar un evento.

2. IDENTIFICACIÓN DE MUTACIONES NO CANÓNICAS EN GENES DRIVER DE NEOPLASIAS MIELOPROLIFERATIVAS

En los últimos años se han identificado mutaciones no típicas en genes driver en pacientes con NMP^{50,141}. Debido a esto decidimos analizar las mutaciones encontradas en los genes JAK2, CALR y MPL con el objetivo de entender mejor la biología de la enfermedad y ayudar al diagnóstico de estas entidades. Se revisaron todas las mutaciones no típicas encontradas en la cohorte de 140 paneles realizados como tarea asistencial, así como en la ampliación de 16 pacientes con TE-TN. Los hallazgos quedan resumidos en la Tabla 15.

Tabla 15.

Mutaciones no canónicas en genes *driver* de NMP identificadas en nuestros pacientes
n: número de pacientes.

GEN	MUTACIÓN	N	VAF (%)	DIAGNÓSTICO	REFERENCIA	PATOGÉNICA POLYPHEN-2	DESCRITA EN PATOLOGÍA
JAK2	p.I682F	1	34.4%	MFP	COSM303887	Sí	LLA-B infantil ^{142,143}
	p.L393V	3	47%/47%/47%	SMD-NMP/ TE/Benigno	rs2230723	No	NMP ^{144,145}
	p.R683G	4	51.4%/44%/50.1%/49%	Trombocitosis Familiar	rs1057519723/ COSM29300	Sí	LLA-B infantil y TE ^{57,142}
	p.H538_K539delinsQL	2	38%/24.89%	PV	COSM24438	Sí	PV ³⁹
	p.K33T	1	54%	Benignidad	rs538474116	No	NMP ¹⁴⁶
	p.D873A	1	50.56%	TE	-	Sí	No descrita
	p.I546_F547ins11	1	15.7%	PV	COSM405279	Si	PV ¹⁴⁷
	p.D544fs	1	52%	Benignidad	-	-	No descrita
	p.G276A	1	49%	NMP-NC	rs759144937	No	No descrita
	p.N1108S	1	48.8%	TE	rs142269166/ COSM33708	No	NMP ^{145,146,148}
	p.T514R	1	47.68%	TE	-	No	No descrita
MPL	p.D261Y	1	29.46%	TE	-	Sí	No descrita
	p.S505C + p.W515R	1	37%	TE	rs1057519752/ COSM86963 + rs1557467539/ COSM29008	Sí	NMP, por separado ¹⁴⁸
CALR	p.E380G	2	49.5%/49.6%	Benignidad/ SMD-NMP	rs201971744	No	TE ¹⁴⁹
	p.K385del	1	48.5%	TE	rs759965223	-	No descrita
	p.K368fs*51	1	49.6%	-	COSM1738368	-	PV ¹⁵⁰
	p.A76G	1	49%	PV	rs528652331	No	No descrita

Se encontraron 17 mutaciones distintas de la JAK2 V617F, CALR tipo I y II y MPL W515K/L. De las mutaciones presentes en JAK2 (11), dos se encontraban en el exón

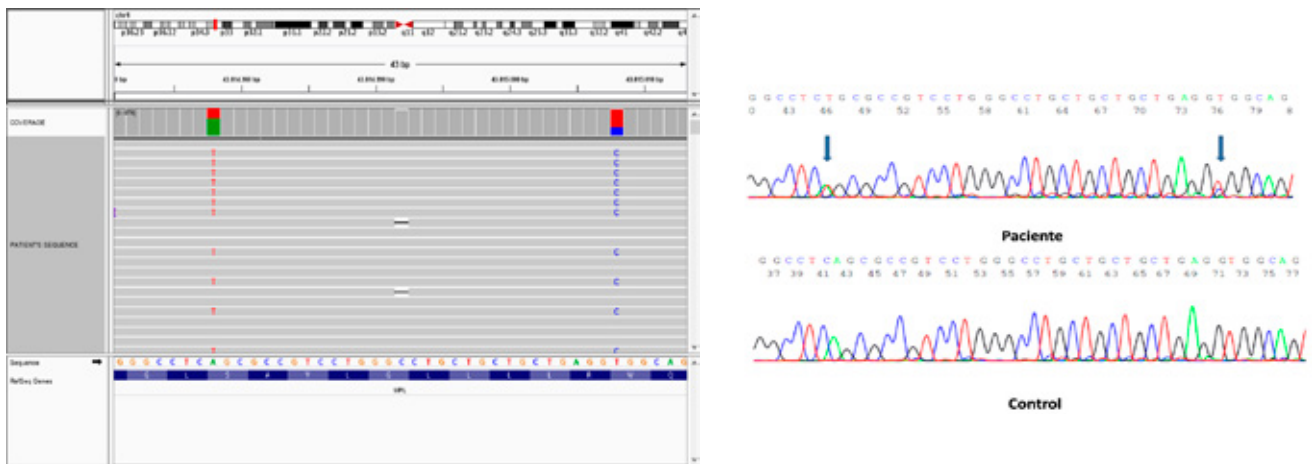
12, típicas de Policitemia Vera. Otras dos mutaciones (I682F y R683G) son típicas de leucemia linfoblásticas B aunque la R683G ya ha sido descrita en trombocitemia esencial. En nuestro caso pertenecía a una familia que sufre una Trombocitosis Familiar. La D873A, no descrita previamente, tiene características patogénicas siendo el resto, tanto las descritas como las que no, de características benignas. Respecto a MPL, identificamos una mutación no descrita previamente y de características patogénicas (D216Y) y una doble mutación en cis S505C y W515R. Esta mutación no se encontraba en la literatura. Por último, destacar la mutación K385del de CALR, no descrita previamente.

3. LA MUTACIÓN S505C DE MPL INCREMENTA LA ACTIVIDAD CONSTITUTIVA DE LOS MUTANTES W515 DE MPL

Dado que tanto MPL como JAK2 median su actividad a través de las proteínas STAT, uno de los métodos utilizados para evaluar los efectos de mutaciones sobre estos genes es el estudio de la actividad transcripcional de STAT5 (ver Materiales y Métodos). Ante el hallazgo de una doble mutación en cis en MPL (S505C y W515R, Figura 18) decidimos caracterizar sus efectos tanto mediante estudios duales de luciferasa para medir la actividad transcripcional de STAT5 como con estudios de proliferación celular en células Ba/F3, dependiente de IL-3. Para ello recurrimos a nuestros colaboradores de la Signal Transduction Unit del Ludwig Institute for Cancer Research de Bruselas, Bélgica.

Figura 18.

Imagen de IGV mostrando las mutaciones en cis $1513A>T$ (p.S505C) y $c.1543T>C$ (p.W515R) del paciente con Trombocitemia Esencial. Estas mutaciones se confirmaron por secuenciación Sanger.



Como puede observarse en la Figura 19 la presencia de la mutación S505C no es capaz de incrementar por si misma la actividad transcripcional de STAT5 ($p=0.2698$, IC de la diferencia de medias $-0,1008-0,2999$ sin trombopoyetina, $p=0.5769$ IC $-3,985-2,437$ con trombopoyetina). Sin embargo, su presencia sí es capaz de aumentar la actividad de MPL W515L ($p=0.0039$ IC $1,828-6,061$) y W515R ($p=0,012$ IC $0,4147-2,252$) en ausencia de trombopoyetina. Esto se ve reflejado en un aumento de la proliferación en ausencia de citoquinas (Figura 20).

Figura 19.
Ensayo de luciferasa que muestra el incremento de actividad transcripcional de STAT5 en los dobles mutantes de MPL
El * representa diferencias con TPOR y ** con TPOR y además entre W515L y W515R y S505C/W515L y S505C/W515R, respectivamente. n=4

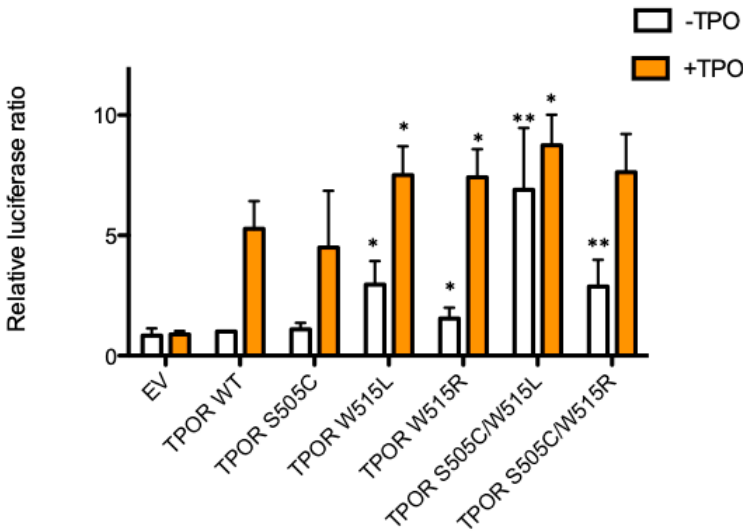
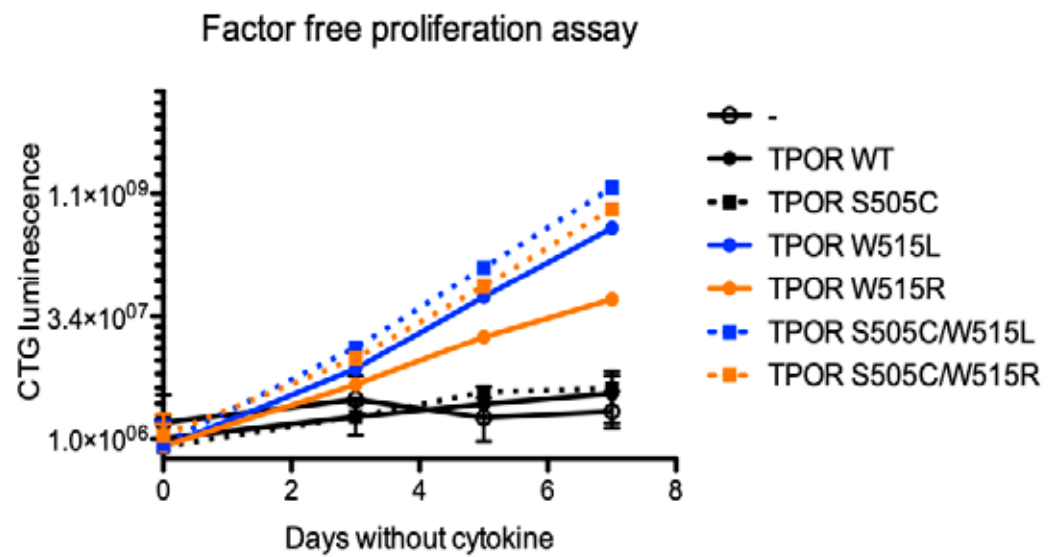


Figura 20.

Ensayo de proliferación que muestra el incremento de la misma en los dobles
mutantes de MPL
n=3.



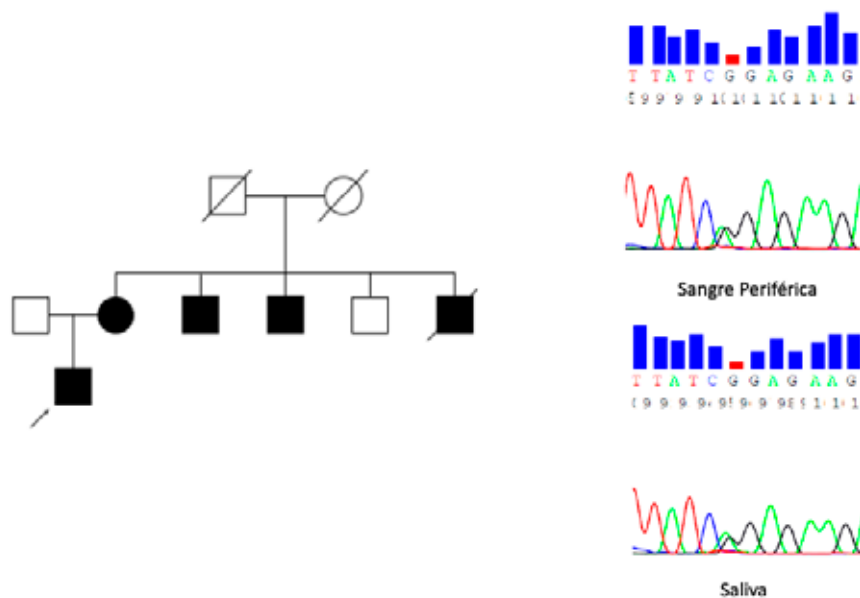
4. LA MUTACIÓN GERMINAL R683G DE JAK2 OCASIONA UN CUADRO DE TROMBOCITOSIS FAMILIAR CON ESPLENOMEGALIA Y TROMBOSIS

4.1 Características Clínicas y Secuenciación

Entre los 140 pacientes secuenciados, como se ha comentado previamente, 4 pertenecen a una familia que padece una Trombocitosis Familiar. El patrón de herencia que sigue corresponde a una herencia autosómica dominante (Figura 21) y los pacientes se caracterizan por esplenomegalia, en algunos casos masiva que ha requerido esplenectomía, trombocitosis y aumento del riesgo de trombosis habiendo sufrido algunos pacientes trombosis en localizaciones atípicas. Se realizó la secuenciación del panel mieloide en el que se identificaron dos mutaciones, la JAK2 c.2047A>G (p.R683G), presente en todos los pacientes y descrita previamente en Leucemia Linfoblástica B, de características patogénicas y la TET2: c3251A>C (p.Gln1084Pro), probablemente benigna y no presente en todos los pacientes. Ambas mutaciones presentaban una frecuencia entre el 45 y el 50%, compatibles con variantes germinales. Se confirmó la presencia de la mutación y origen germinal mediante secuenciación Sanger de la sangre y saliva de los 4 pacientes secuenciados por NGS y de otro hermano más (Figura 21).

Figura 21.**Pedigrí de la familia con mutación en R683G de JAK2 y confirmación por secuenciación Sanger en sangre periférica y saliva**

Se secuenciaron 4 pacientes y un familiar sano por esta técnica. El familiar sano no presentaba la mutación.

**4.2 Caracterización de la mutación R683G de JAK2**

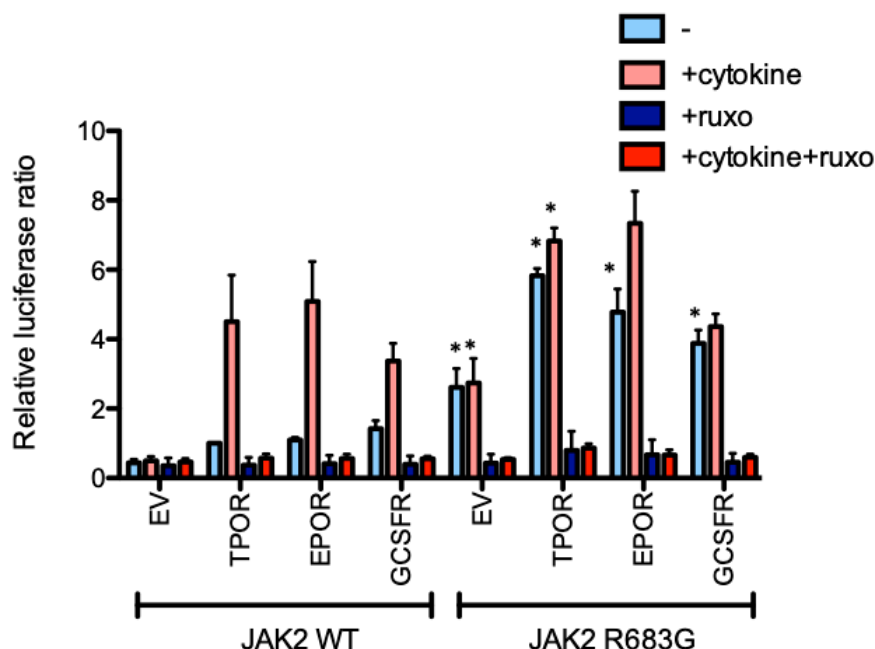
Se evaluó la actividad transcripcional de STAT5 en presencia de la mutación mediante el ensayo de luciferasa, evaluándose también la sensibilidad de la misma a ruxolitinib, un inhibidor de proteínas JAK usado en clínica para el tratamiento de las NMP. Como puede observarse en la Figura 22, la mutación R683G presenta una gran actividad de manera constitucional, independiente de citoquinas y es inhibida por el fármaco ruxolitinib. El IC de la diferencia de las medias entre JAK2 *wild-type* y JAK2 R683G fue de 1,299-3,061 $p=0.0024$ con el vector vacío (EV), de 4,488-5,167 $p<0.0001$ con TPOR, de

2,596-4,757 $p=0.0007$ con EPOR y de 1,735-3,182 $p=0.0007$ con GCSFR en ausencia de citoquinas. En presencia de las mismas se mantuvieron diferencias para la transfección sin receptor y la transfección con TPOR (1,088-3,396 $p=0.0057$ y 0,09574-4,555 $p=0.0044$, respectivamente (Figura 22).

Figura 22.

Ensayo de Luciferasa que muestra la cuantificación de la actividad de STAT5 en presencia de JAK2 normal y JAK2 R683G con y sin citoquinas y en presencia de ruxolitinib o sin ella

El * indica diferencias estadísticamente significativas entre WT y R683G (por ejemplo, EV JAK2 WT sin citoquinas vs EV JAK2 R683G sin citoquinas). $n=3$.



4.3 Exomas en la familia a estudio

Para descartar que hubiese otra mutación en la familia que explicase el fenotipo, se decidió realizar exoma completo a 5 familiares, 4 afectados y uno sano. Tras realizar el análisis pertinente solamente se encontró la JAK2 R683G como la causal de esta Trombocitosis Familiar de fenotipo agresivo (Tabla 16). Como detalle a destacar, la variante R683G se encuentra registrada en dbSNP. Debido a esto se decidió no utilizar dbSNP como método de filtrado de variantes.

Tabla 16.

Variantes seleccionadas tras filtrado según Materiales y Métodos

Estas variantes se encontraban en todos los individuos afectados.

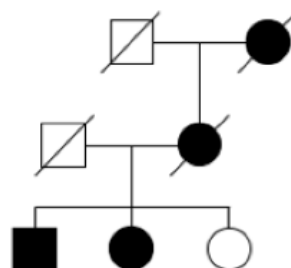
POSICIÓN	GEN	FUNCIÓN	CAMBIO EN EL DNA	TIPO DE MUTACIÓN	PROTEÍNA	POLYPHEN-2
1: 227300469	CDC42BPA	Serín-treonín cinasa	c.1793G>T	Cambio de sentido	p.R598L	Dañina
1: 228557755	OBSCN	Citoesqueleto	c.22951G>A	Cambio de sentido	p.A7651T	Dañina
1: 240370941	FMN2	Citoesqueleto	c.2856_2888delACCCGGA-GCGGCAATACCCCCTC-CGCCCCCTCT	Delección sin cambio del marco de lectura	p.P953_L963del	-
2: 20205863	MATN3	Matriz extracelular	c.432G>C,	Cambio de sentido	p.Q144H	Dudosa
2: 135308169	TMEM163	Transmembrana/ Vesículas	c.430G>A	Cambio de sentido	p.A144T	Dañina
2: 135743594	MAP3K19	Serín-treonín cinasa	c.2848A>G	Cambio de sentido	p.N950D	Benigna
2: 135745034	MAP3K19	Serín-treonín cinasa	c.1408A>G	Cambio de sentido	p.I470V	Benigna
3: 48677893	CELSR3	Cadherina	c.9125T>C	Cambio de sentido	p.V3042A	Dañina
3: 49153758	USP19	Deubiquitinasa	c.1310C>T	Cambio de sentido	p.P437L	Dañina
4: 30724609	PCDH7	Cadherina	c.1565T>C	Cambio de sentido	p.I522T	Benigna
4: 175898914	ADAM29	Metaloproteasa	c.2239_2258delCCTTCCCA-GAGTCATCCTCA	Delección con cambio de marco de lectura	p.P747fs	-
8: 48626144	SPIDR	Reparación DNA	c.2282C>T	Cambio de sentido	p.P761L	Dañina
8: 61777914	CHD7	Helicasa	c.8416C>G	Cambio de sentido	p.L2806V	Dudosa
8: 65494020	BHLHE22	Factor de Transcripción	c.701_703dupGCA	Inserción sin cambio del marco de lectura	p.S234dup	-
9:00 5078360	JAK2	Tirosina cinasa	c.2047A>G	Cambio de sentido	p.R683G	Dañina
9:00 136302010	ADAMTS13	Metaloproteasa	c.1370C>T	Cambio de sentido	p.P457L	Dañina
9:00 140318050	NOXA1	Activador NADPH Oxidasa	c.69G>A	Codón de parada	p.W23*	-
10:00 96522463	CYP2C19	Citocromo P450	c.1A>G	Pérdida de codón de inicio	p.M1?	Dañina
12: 124968299	NCOR2	Histona Deacetilasa	c.254G>A	Cambio de sentido	p.R85Q	Benigna
15: 89169703	AEN	Exonucleasa/ Apoptosis	c.263C>G	Cambio de sentido	p.S88C	Dudosa

5. USO DE SECUENCIACIÓN COMPLETA DEL EXOMA (WES) PARA LA IDENTIFICACIÓN DE GENES CANDIDATOS CAUSANTES DE NEOPLASIAS MIELOPROLIFERATIVAS

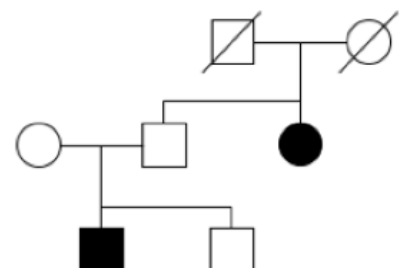
Dado el hallazgo de la Trombocitosis Familiar causada por JAK2 R683G se decidió estudiar los casos de Neoplasia Mieloproliferativas Crónicas familiares del Servicio de Hematología del Hospital Universitario 12 de Octubre de Madrid. Se identificaron 2 familias (Figura 23).

Figura 23.

Pedigrí de las familias estudiadas por WES



Familia 1



Familia 2

La Familia 1 presenta una abuela fallecida por una neoplasia hematológica no identificable (no poseemos historia clínica), una madre con una Policitemia Vera JAK2 V617F positiva ya fallecida tras progresión a Mielofibrosis y dos hijos con Policitemia Vera V617F positiva, la hija además con un diagnóstico de Leucemia Mielomonocítica Crónica. La Familia 2 presenta una tía y un sobrino afectados también de Policitemia Vera JAK2 V617F positiva.

Se realizó exoma a cuatro miembros de la Familia 1 (3 afectados y uno sano) y a 3 de la Familia 2 (2 afectados y uno sano) tratando de identificar mutaciones candidatas en ambos casos. En este caso, al no ser la penetrancia completa y obtenerse un mayor número de variantes, se restringió el análisis por predicción de patogenicidad por PolyPhen-2.

En el caso de la familia 1 se encontraron 77 variantes presentes en los 3 pacientes que cumplían los requisitos mencionados en la sección Materiales y Métodos (más de 10 lecturas, una frecuencia alélica superior al 25%, ausencia de variantes no codificantes salvo las de sitios de *splicing* y estar presentes en menos de un 1% de la población. Todas las variantes se encontraban descritas en dbSNP. Tras seleccionar las variantes deletéreas según el predictor PolyPhen-2 se seleccionaron 19 variantes candidatas (Tabla 17).

Tabla 17.

Variantes seleccionadas tras filtrado en familia 1

POSICIÓN	GEN	FUNCIÓN	CAMBIO EN EL DNA	TIPO DE MUTACIÓN	PROTEÍNA
1: 5935096	NPHP4	Citoesqueleto	c.2882G>A	Cambio de sentido	p.Arg961His
1: 16456763	EPHA2	Receptor Tirosin cinasa	c.2627G>A	Cambio de sentido	p.Arg876His
1: 45798475	MUTYH	Reparación DNA	c.536A>G	Cambio de sentido	p.Tyr179Cys
1: 160915019	ITLN2	Unión a Carbohidratos	c.889G>A	Cambio de sentido	p.Ala297Thr
2: 26686872	OTOF	Transporte de Vesículas	c.5063C>T	Cambio de sentido	p.Thr1688Met
2: 198646549	BOLL	Unión a RNA/Meiosis	c.44C>A	Cambio de sentido	p.Ser15Tyr
2: 236626225	AGAP1	Transporte de Vesículas	c.247G>A	Cambio de sentido	p.Gly83Ser
3: 186338565	AHSG	Glicoproteína/ Desarrollo	c.950G>A	Cambio de sentido	p.Arg317His
6: 136599822	BCLAF1	Apoptosis	c.197G>C	Cambio de sentido	p.Gly66Ala
6: 138751629	NHSL1	Citoesqueleto	c.3865C>G	Cambio de sentido	p.Pro1289Ala
6: 161022107	LPA	Serín-treonín cinasa	c.2969G>A	Cambio de sentido	p.Arg990Gln
7: 1487278	MICALL2	Citoesqueleto	c.458C>T	Cambio de sentido	p.Ser153Phe
7: 5417170	TNRC18	Unión a cromatina	c.2293C>T	Cambio de sentido	p.Pro765Ser
7: 76062913	ZP3	Zona Pelúcida	c.662C>G	Cambio de sentido	p.Pro221Arg
7: 99627504	ZKSCAN1	Factor de Transcripción	c.601C>G	Cambio de sentido	p.Pro201Ala
7: 100371479	ZAN	Adhesión	c.5765G>C	Cambio de sentido y de splicing	p.Arg1922Pro
8: 145169485	WDR97	-	c.3821T>C	Cambio de sentido	p.Leu1274Pro
19: 40321404	DYRK1B	Ciclo celular	c.83T>C	Cambio de sentido	p.Leu28Pro
20: 45179197	OCSTAMP	Diferenciación osteoclastos	c.3G>A	Pérdida de codón de inicio	p.Met1?

En el caso de la familia 2 se encontraron 79 variantes comunes a los dos pacientes afectados, que finalmente fueron 25 tras filtrar según el predictor (Tabla 18).

Tabla 18.
Variantes seleccionadas tras filtrado en familia 2

POSICIÓN	GEN	FUNCIÓN	CAMBIO EN EL DNA	TIPO DE MUTACIÓN	PROTEÍNA
1: 985340	AGRN	Unión neuromuscular	c.4802C>T	Cambio de sentido	p.Ala1601Val
1: 235577776	TBCE	Citoesqueleto	c.214C>T	Cambio de sentido	p.Pro72Ser
1: 245848878	KIF26B	Citoesqueleto	c.2593G>A	Cambio de sentido	p.Val865Ile
2: 62066571	FAM161A	Desarrollo retina	c.1568G>A	Cambio de sentido	p.Arg523Gln
2: 71376471	MPHOSPH10	Mitosis	c.1784G>A	Cambio de sentido	p.Arg595Gln
2: 113539246	IL1A	Citoquina	c.254G>A	Cambio de sentido	p.Arg85Gln
2: 152426684	NEB	Citoesqueleto	c.17341G>C	Cambio de sentido	p.Asp5781His
4: 177089839	WDR17	Desconocida/Telomeros?	c.3124C>G	Cambio de sentido	p.Leu1042Val
6: 4068950	FAM217A	Desconocida	c.1507T>C	Cambio de sentido	p.Ser503Pro
6: 26092985	HFE	Metabolismo del Hierro	c.689A>G	Cambio de sentido	p.Tyr230Cys
6: 26392768	BTN2A2	Metabolismo de Lípidos	c.1145A>T	Cambio de sentido	p.His382Leu
6: 30138775	TRIM15	Inmunidad Innata/ Interferón	c.870A>T	Cambio de sentido	p.Glu290Asp
6: 31864556	EHMT2	Regulador Epigenético	c.326C>G	Cambio de sentido	p.Pro109Arg
6: 46793131	MEP1A	Metalopeptidasa	c.679A>G	Cambio de sentido	p.Thr227Ala
7: 97920549	BRI3	Chaperona/Inmunidad/ Nervioso	c.372C>G	Cambio de sentido	p.Phe124Leu
7: 120911438	CPED1	Citoesqueleto	c.2822G>A	Cambio de sentido	p.Arg941His
7: 143013391	CLCN1	Canal de Cloro	c.86A>C	Cambio de sentido	p.His29Pro
7: 143771934	OR2A25	Receptor Olfatorio	c.622G>A	Cambio de sentido	p.Gly208Arg
7: 158557453	ESYT2	Metabolismo de Lípidos	c.1160A>G	Cambio de sentido	p.Tyr387Cys
7: 158823347	VIPR2	Motilidad Intestinal	c.1277G>T	Cambio de sentido	p.Arg426Leu
8: 10387166	PRSS55	Serín-proteasa	c.304T>G	Cambio de sentido	p.Trp102Gly
8: 100832259	VPS13B	Transporte de vacuolas	c.8978A>G	Cambio de sentido	p.Asn2993Ser
11: 281692	NLRP6	Inflamación	c.1958G>C	Cambio de sentido	p.Arg653Pro
11: 63978867	FERMT3	Adhesión	c.635G>A	Cambio de sentido	p.Arg212His
19: 1495338	REEP6	Transporte de receptores	c.161C>T	Cambio de sentido	p.Ala54Val

6. CARACTERIZACIÓN FUNCIONAL DEL HAPLOTIPO 46/I DE JAK2 Y SU IMPLICACIÓN EN LA ETIOPATOGENIA DE LAS NEOPLASIAS MIELOPROLIFERATIVAS

El estudio de la trombocitosis familiar y los casos de NMP familiares hizo que nos interesásemos también por el riesgo genético de padecer NMP esporádicas. Dada la importancia aparente del haplotipo 46/1 de JAK2 en la etiopatogenia de las Neoplasias Mieloproliferativas decidimos centrarnos en su caracterización clínica, analítica, estructural y ómica. Para ello nos valimos de dos estrategias: haplotipado de los participantes en el estudio PESA y análisis de los datos ya recogidos en el mismo (variables clínicas, analíticas y ómicas) y estudios funcionales en células de sangre periférica de donantes (estructura de la cromatina y expresión diferencial de genes según tipo celular).

6.1 Descripción de las diferencias entre haplotipos usando datos del estudio PESA: características clínicas, analíticas, transcriptómicas y proteómicas

Como se ha comentado en la sección de Materiales y Métodos, el estudio PESA, dirigido por el Dr. Valentín Fuster del Centro Nacional de Investigaciones Cardiovasculares, tiene como objetivo en estudio de la enfermedad aterosclerótica subclínica. Entre los

objetivos secundarios del mismo se encuentra el estudio del transcriptoma y proteoma de los participantes. Los sujetos del estudio habían sido estudiados en una visita de inicio (visita 1) y otra posterior tres años después (visita 2)

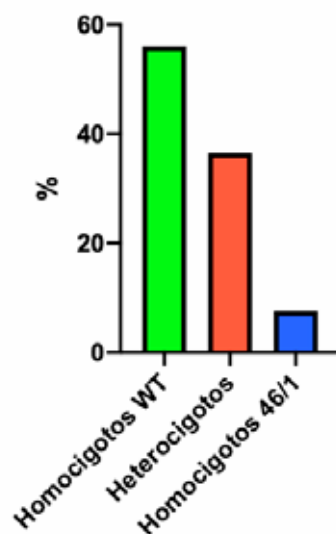
De los 4184 participantes del estudio, en principio población sana de entre 40 y 55 años, tuvimos acceso a datos y DNA para haplotipar de 509 pacientes. Un 56% resultaron homocigotos para el haplotipo normal o *wild-type* (WT), un 36.5% heterocigotos y un 7.5% homocigotos para el haplotipo 46/1. Esto da una frecuencia del alelo menor (minor allele frequency o MAF) de un 0.2574, ligeramente inferior a la descrita de un 0.28^{94,104} (Figura 24).

Figura 24.

Distribución de haplotipos de JAK2 en los 509 participantes analizados del estudio PESA

Se representa en % del total.

Distribución Haplotipos Estudio PESA



6.1.1 Características clínicas y bioquímicas

Se estudiaron las características clínicas de los participantes además de su perfil lipídico y marcadores de inflamación (velocidad de sedimentación globular, proteína C reactiva). No se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los distintos haplotipos en ninguna de las variables en ninguna de las visitas. La Tabla 19 representa las características de los pacientes en la visita de inicio.

Tabla 19.

Características clínicas y bioquímicas de la cohorte PESA en función del haplotipo de JAK2 en la visita 1

Entre paréntesis se encuentran los intervalos de confianza. TAS (tensión arterial sistólica) TAD (tensión arterial diastólica), IMC (índice de masa corporal), FRCV (factores de riesgo cardiovascular), CV (cardiovascular), AHA (American Heart Association), ACC (American College of Cardiology), VSG (Velocidad de Sedimentación Globular), PCR (proteína C reactiva). Las cifras entre corchetes representan el rango intercuartílico.

	TOTAL (N=509)	HOMOCIGOTOS 46/I (N=38)	HOMOCIGOTOS WT (N=285)	HETEROCIGOTOS (N=186)
Edad (años)	48,1 ± 4.08	48.7 ± 3.5	47.8 ± 4.03	48.3 ± 4.26
Sexo (Hombre, %)	440 (86.4)	32 (84.2)	247 (86.7)	161 (86.6)
TAS (mmHg)	120 ± 12.9	123 ± 11.5	120 ± 13.4	120 ± 12.3
TAD (mmHg)	75.3 ± 9.7	77.2 ± 9.2	75.2 ± 10.4	75 ± 8.7
IMC (Kg/m2)	26.8 ± 3.5	27.6 ± 3.7	26.6 ± 3.3	27.1 ± 3.7
FRCV				
Dislipemia (%)	301 (59.1)	22 (57.9)	178 (62.5)	101 (54.3)
Diabetes (%)	17 (3.3)	0 (0)	7 (2.5)	10 (5.4)
Hipertensión (%)	108 (21.2)	7 (18.4)	60 (21.0)	41 (22.0)
Fumador (%)	130 (25.5)	9 (23.7)	75 (26.3)	46 (24.7)
Obesidad (%)	83 (16.3)	9 (23.7)	39 (13.7)	35 (18.8)
Historia familiar enfermedad CV	100 (19.6)	7 (18.4)	55 (19.3)	38 (20.4)
Riesgo a 10 años (AHA/ACC)	3.9 [2.3 - 6.1]	4.1 [2.6 - 6.3]	3.7 [2.2 - 6.3]	3.9 [2.3 - 6.1]
Bioquímica				
Colesterol Total (mg/dL)	204 ± 33.2	203 ± 33.8	204 ± 32.8	206 ± 33.8
HDL (mg/dL)	45.4 ± 11.7	44.4 ± 8.04	45.5 ± 13	45.4 ± 10.3
LDL (mg/dL)	138 ± 29	138 ± 28.1	137 ± 28.3	139 ± 30.4
Triglicéridos (mg/ dL)	91 [67 - 125]	89.5 [75 - 108]	89 [65 - 125]	92.5 [69 - 127]
Glucosa (mg/dL)	92 [86 - 98]	94 [87 - 100]	92 [86 - 98]	92 [86 - 98]
HbA1c (%)	5.5 [5.3 - 5.8]	5.5 [5.4 - 5.8]	5.5 [5.3 - 5.8]	5.5 [5.3 - 5.8]
VSG	5 [4 - 7]	5 [4 - 7]	5 [4 - 7]	5 [4 - 7]
PCR (mg/mL)	0.11 [0.06 - 0.20]	0.10 [0.07 - 0.18]	0.10 [0.06 - 0.20]	0.12 [0.06 - 0.20]

6.1.2 Hemograma

Se analizaron también los datos del hemograma tanto en la visita de inicio como en la visita a los tres años. No se encontraron hallazgos significativos salvo en el porcentaje de monocitos (0.697% (0,087-1.31) $p=0.025$) en la visita 1 y de linfocitos (-2,648% (-5,146 - -0,149) $p=0.038$) en la visita 2 que se encontraban aumentados y disminuidos en los 46/1 homocigotos en comparación con los homocigotos *wild-type*, respectivamente. Se estudió entonces el cociente monocito/linfocito, encontrándose éste aumentado en ambas visitas (0,031 (0,005-0,058) $p= 0,022$ en visita 1 y 0,032 (0,002-0,063) $p= 0,039$ en visita 2). Estas diferencias se mantuvieron tras ajustar por edad y sexo ($p=0.025$ y 0.041). La tabla 20 contiene los datos de hemograma de la cohorte PESA en la visita 1.

Tabla 20.

Tabla descriptiva de los resultados de hemograma de la cohorte de PESA en función del haplotipo de JAK2 en la visita 1

	TOTAL (N=509)	HOMOCIGOTOS 46/1 (N=38)	HOMOCIGOTOS WT (N=285)	HETEROCIGOTOS (N=186)
Hematíes (x106/ μ l)	4.87 [4.61 - 5.13]	4.9 [4.58 - 5.31]	4.86 [4.62 - 5.11]	4.87 [4.61 - 5.17]
Hemoglobina (g/dl)	15 [14.3 - 15.7]	14.95 [14.4 - 15.7]	15.1 [14.3 - 15.7]	14.9 [14.3 - 15.6]
Hematocrito (%)	44.3 [42 - 46.2]	44.45 [42.2 - 46.7]	44.4 [42.2 - 46.2]	44.05 [41.8 - 46]
VCM (fl)	90.6 [88.4 - 93.1]	90.9 [89 - 93.2]	91 [88.5 - 93.1]	89.95 [87.9 - 92.8]
HCM (pg)	30.7 [29.8 - 31.7]	30.8 [29.5 - 31.9]	30.7 [29.9 - 31.7]	30.6 [29.7 - 31.6]
CHCM (g/dl)	34 [33.4 - 34.4]	33.95 [33.1 - 34.6]	34 [33.3 - 34.3]	34 [33.4 - 34.4]
RDW (%)	14.4 [13.8 - 15]	14.15 [13.7 - 14.8]	14.4 [13.8 - 14.9]	14.5 [13.8 - 15.1]
Plaquetas (x103/ μ l)	216 [190 - 250]	204.5 [182 - 246]	215 [190 - 250]	222 [192 - 250]
Leucocitos (x103/ μ l)	5.6 [4.83 - 6.83]	5.85 [4.5 - 6.88]	5.72 [4.88 - 6.78]	5.52 [4.79 - 6.83]
Neutrófilos (x103/ μ l)	3.17 [2.68 - 3.93]	3.28 [2.61 - 4.05]	3.18 [2.71 - 3.97]	3.13 [2.67 - 3.9]
Linfocitos (x103/ μ l)	1.76 [1.47 - 2.1]	1.72 [1.37 - 2.07]	1.77 [1.48 - 2.13]	1.75 [1.47 - 2.08]
Monocitos (x103/ μ l)	0.41 [0.34 - 0.51]	0.44 [0.33 - 0.52]	0.41 [0.34 - 0.51]	0.41 [0.34 - 0.5]
Eosinófilos (x103/ μ l)	0.13 [0.08 - 0.2]	0.14 [0.08 - 0.21]	0.13 [0.08 - 0.2]	0.13 [0.08 - 0.2]
Basófilos (x103/ μ l)	0.05 [0.04 - 0.07]	0.05 [0.03 - 0.06]	0.05 [0.04 - 0.07]	0.05 [0.04 - 0.07]
% Neutrófilos	57 [52.2 - 62]	58 [51.6 - 62.2]	57 [52.2 - 62.5]	56.9 [52.3 - 61.4]
% Linfocitos	31.5 [27.3 - 35.8]	30.2 [25.9 - 36.1]	31.7 [27.5 - 35.8]	31.5 [27 - 35.8]
% Monocitos	7.4 [6.2 - 8.6]	8 [6.3 - 9.1]*	7.3 [6.2 - 8.6]	7.4 [6.3 - 8.4]
% Eosinófilos	2.3 [1.4 - 3.4]	2.55 [1.3 - 3.3]	2.2 [1.4 - 3.4]	2.2 [1.5 - 3.3]
% Basófilos	0.9 [0.7 - 1.2]	0.8 [0.6 - 1]	0.9 [0.7 - 1.2]	0.9 [0.7 - 1.2]
Monocitos/Linfocitos	0.24 [1.81 - 123.40]	0.25 [1.89 - 120.56]*	0.24 [1.80 - 122.34]	0.23 [1.81 - 124.6]

6.1.3 Estudio de RNA-seq en células totales de sangre periférica

Analizamos los datos del RNA-seq de la visita de inicio y la visita 2 realizados por el estudio PESA. Comparando la población homocigota para el 46/1 versus la población homocigota para el alelo normal se encontraron diferencias estadísticamente significativas en 759 genes (de 12060) para la visita 1 y 871 (de 12081) para la visita 2. En la visita

1 395 y 364 genes presentaban un aumento y una disminución de expresión respectivamente. En la visita 2 350 genes estaban sobreexpresados y 521 presentaban una expresión disminuida. Sin embargo, estas diferencias perdieron la significación estadística cuando se ajustó por comparaciones múltiples.

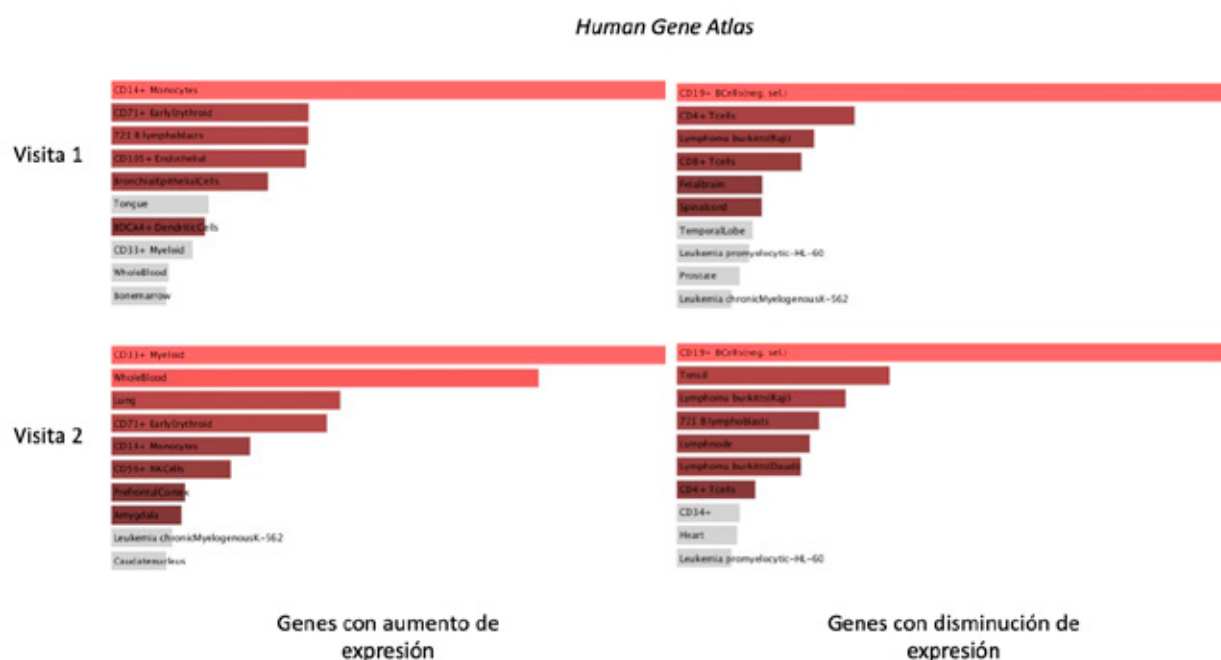
En cualquier caso, decidimos realizar un análisis de enriquecimiento del conjunto de genes (*gene set enrichment analysis*) que habían resultado significativos individualmente para estudiar que vías funcionales o genes específicos de línea celular podían encontrarse más o menos activos según el haplotipo.

Para ello utilizamos la aplicación Enrichr que permite cruzar una lista de genes con numerosas bases de datos y que aporta un p valor, un z-score y un score combinado según un algoritmo propio que permiten identificar enriquecimientos significativos.

Según el *Human Gene Atlas*, para las dos visitas, los genes relacionados con la línea linfocitoide y el sistema inmune presentaban una menor expresión en aquellos participantes homocigotos para el haplotipo 46/1 mientras que aquellos relacionados con la línea mieloide (específicamente las líneas monocitoide y eritroide) se encontraban sobreexpresados. (Figura 25).

Figura 25.

Análisis de Enriquecimiento Génico utilizando la aplicación web Enrichr
Se usó la base de datos Human Gene Atlas que muestra genes upregulados en distintos tejidos humanos.



Se combinaron las dos series encontrándose 86 genes significativos en ambas visitas, 20 con aumento de expresión y 60 con disminución. El análisis de los genes *downregulados* volvió a poner de manifiesto una disminución de genes de línea linfóide.

6.1.4 Estudio de Proteómica

Se analizaron también los datos de proteómica del estudio PESA, sin embargo, solamente se identificaron 11 genes en la visita 1 (7 más expresados y 4 menos expresados en el haplotipo 46/1) y 2 genes en la visita 2 (ambos menos expresados en el haplotipo 46/1). De estos, ningún gen coincidió en ambas visitas por lo que se decidió no realizar más análisis.

6.2 Uso de estudios de Captura Circularizada de la Conformación Cromosómica para estudiar la estructura del Haplotipo 46/1 de JAK2

El haplotipo 46/1 no presenta cambios en la secuencia proteica de JAK2, INSL4 o INSL6. Por tanto, el aumento del riesgo de padecer Neoplasias Mieloproliferativas debe estar mediado por secuencias no codificantes, reguladoras, que cambien el plegamiento y/o las interacciones del haplotipo con otras regiones del genoma. Debido a esto decidimos realizar un estudio de captura circularizada de la conformación cromosómica para estudiar la estructura e interacciones diferenciales entre haplotipos.

6.2.1 Diferencias en interacciones genómicas entre haplotipos

Se realizó el experimento 4C-seq en neutrófilos de cuatro donantes sanos, dos homocigotos para el haplotipo *wild-type* y dos homocigotos para el haplotipo 46/1. Se diseñaron 12 viewpoints diferentes de los cuales 9 pudieron ser analizados bioinformáticamente para obtener conclusiones.

Se analizaron 3 *viewpoints* por encima del gen JAK2 (VP 2, 3 y 4), todos ellos dentro del bloque de desequilibrio de ligamiento (en inglés LD block) de JAK2. El VP 4 se encontraba en el promotor de JAK2 mientras que VP2 y VP3 en regiones reguladoras *upstream*. Dentro del gen JAK2 se estudiaron 2 *viewpoints* (VP8 y VP10). Por debajo de JAK2, pero dentro de su LD block se estudió el VP5 y justo fuera del mismo se encuentra el VP6. Por último, se estudiaron dos regiones en torno al gen SMARCA2, un regulador epigenético que en un primer 4C-seq parecía tener interacciones diferenciales entre haplotipos.

Sorprendentemente se observaron interacciones entre la región de JAK2 y la región donde se encuentran los genes PD-L1 (CD274), PD-L2 (PDCD1LG2) y KIAA1432. Estas interacciones se encuentran a más de 500kb del locus de JAK 2 y parecen ser distintas entre haplotipos, teniendo el haplotipo 46/1 un mayor número de interacciones con las regiones promotoras de dichos genes. Las Figuras 26 y 27 muestra los perfiles de interacciones más relevantes.

Figura 26.

Perfiles de interacciones de cromatina de los VP 3, 8 y 5

Los tres viewpoints se encuentran dentro del bloque con desequilibrio de ligamiento de JAK2.

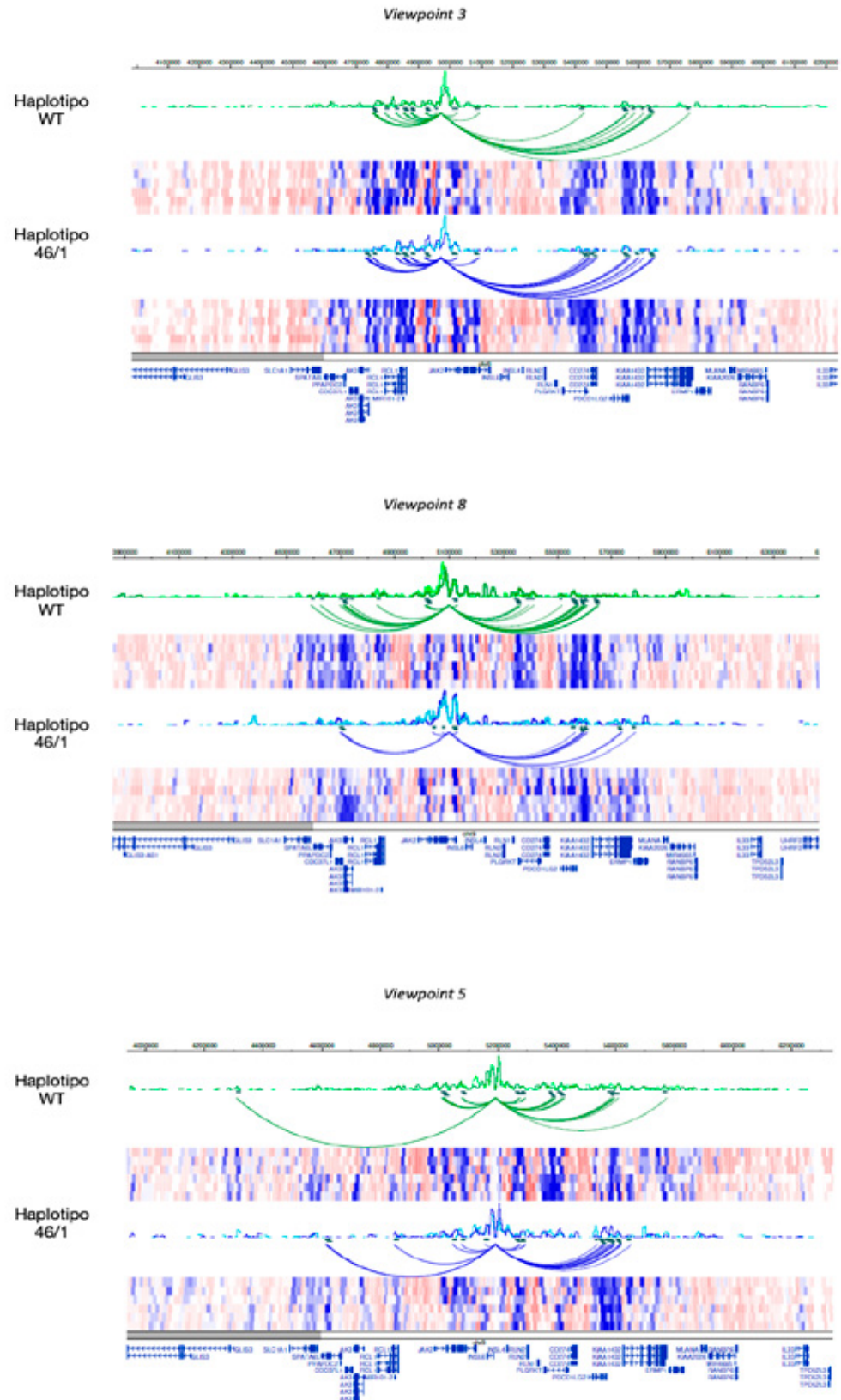
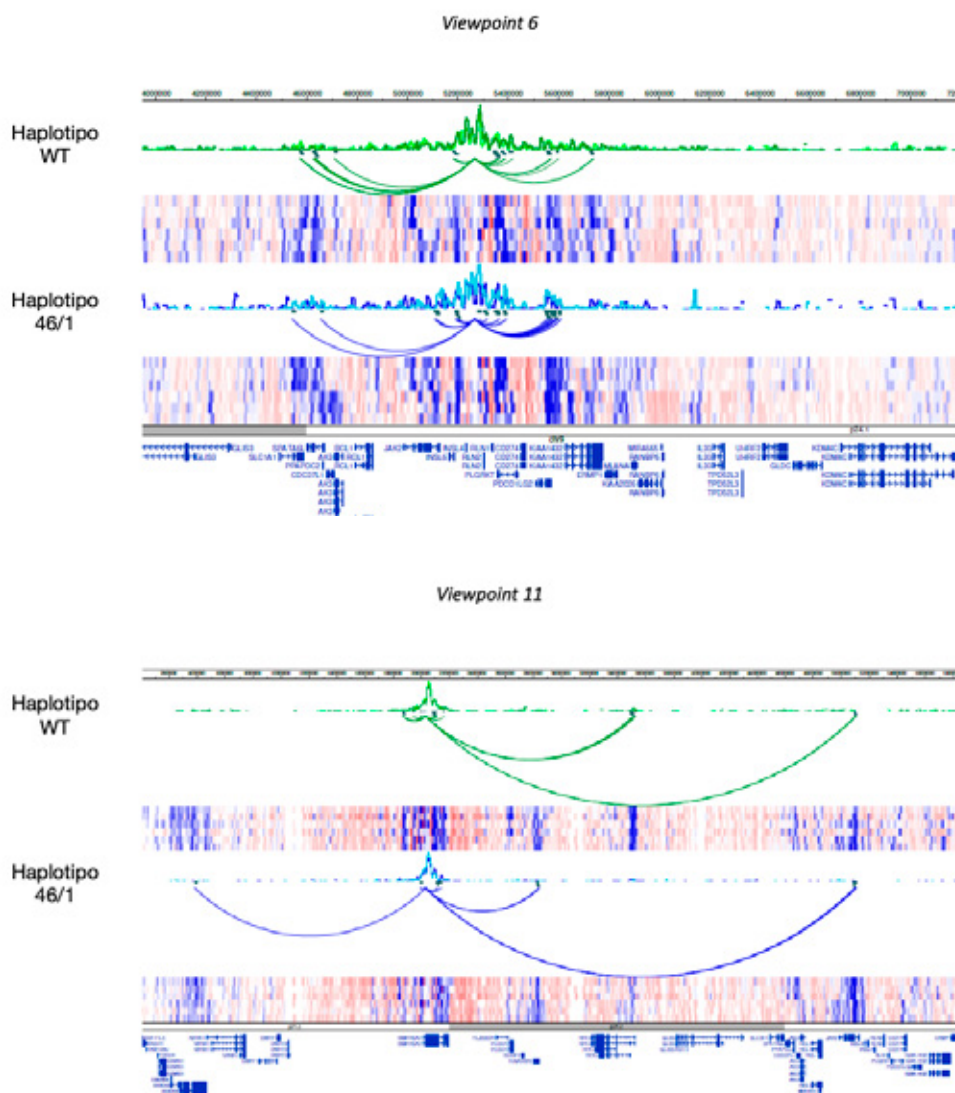


Figura 27.

Perfiles de interacciones de cromatina de los VP 6 y 11

Los dos viewpoints se encuentran por encima (VP11) y debajo (VP6) del bloque con desequilibrio de ligamiento de JAK2.



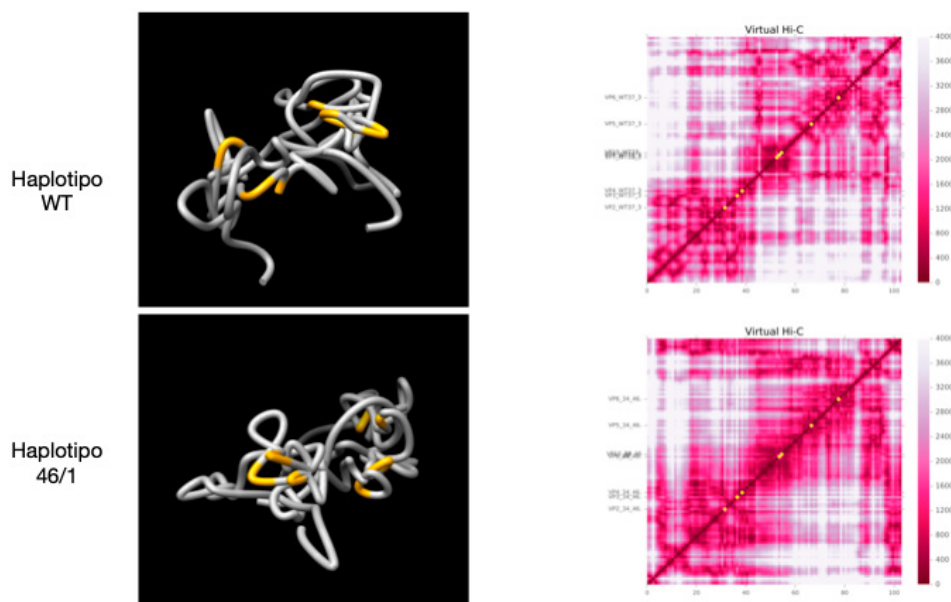
6.2.2 Modelo tridimensional del Haplotype 46/1

Aunque la técnica del 4C está diseñada para estudiar las interacciones de una sola región, nuestros colaboradores del grupo de José Luis Gómez-Skarmeta en el Centro Andaluz de Biología del Desarrollo en Sevilla han diseñado una *pipeline* bioinformática que permite estimar la estructura tridimensional de una región con los datos de distintos *viewpoints* analizados por 4C, lo que podría denominarse Hi-C virtual.

Se realizó dicho análisis con el objeto de entender mejor la organización del haplotipo. Sin embargo, y probablemente debido a la cercanía de los distintos *viewpoints*, no se obtuvo una imagen que aportase información concluyente (Figura 28).

Figura 28.

Modelo 3D y Hi-C Virtual realizado con los *viewpoints* 2-8 y 10 del experimento 4C-seq



6.3 Expresión diferencial de genes de interés en poblaciones celulares de sangre periférica

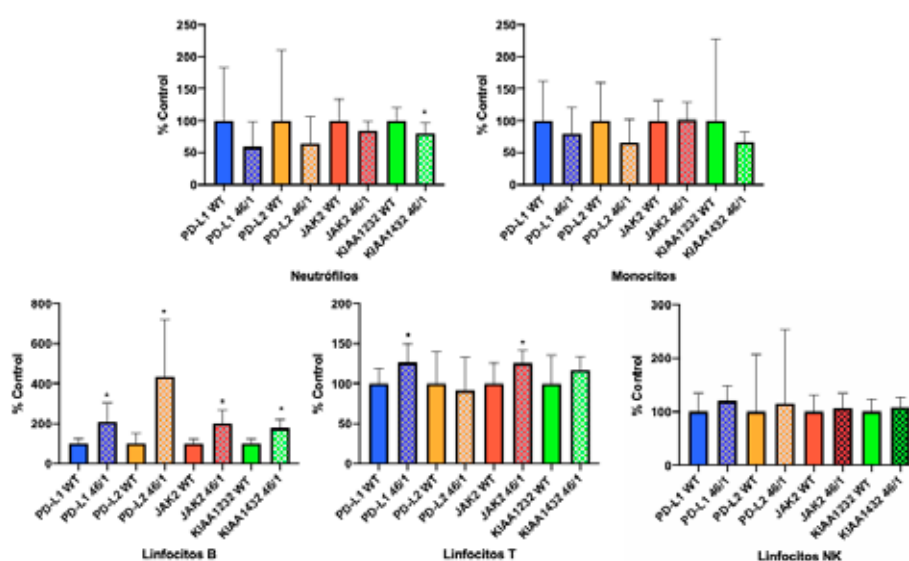
Ante el hallazgo de que el locus de JAK2 interacciona con el de los genes PD-L1, PD-L2 y KIAA1432 y dado que los contactos parecen distintos entre el haplotipo *wild-type* y el 46/1 decidimos estudiar la expresión diferencial de estos genes. Como no se habían encontrado diferencias en la expresión de estos genes en el RNA-seq de células totales del estudio PESA decidimos realizar RT-qPCR en distintos tipos celulares de sangre periférica de donantes sanos separados por ficoll y *sorting* celular.

No se encontraron diferencias significativas en las células de estirpe mieloide estudiadas (neutrófilos y monocitos) salvo una menor expresión de KIAA1432 en neutrófilos ($-20,04 \pm 9,111\%$ $p=0.0439$) (Figura 29).

Figura 29.

RT-qPCRs de los genes PD-L1, PD-L2, JAK2 y KIAA1432 en distintos haplotipos según el tipo celular en sangre periférica de donantes sanos

Para haplotipo *wild-type* $n=9$ y para haplotipo 46/1 $n=8$. Todas las RT-qPCRs se realizaron por triplicado. El gen control utilizado fue GAPDH. La barra de error representa la desviación estándar.



Sin embargo, sorprendentemente, sí se observaron diferencias estadísticamente significativas en la expresión de genes en linfocitos B y T. En linfocitos B todos los genes se encontraban sobreexpresados (PD-L1 ($109,7 \pm 32,02\%$ $p=0.0037$), PD-L2 ($335,1 \pm 96,45\%$ $p=0.0037$), JAK2 ($101,0 \pm 22,87\%$ $p=0.0005$), KIAA1432 ($78,01 \pm 16,48\%$ $p=0.0003$). En linfocitos T PD-L1 ($26,35 \pm 10,30\%$ $p=0.0219$) y JAK2 ($25,35 \pm 10,72\%$ $p=0.0319$) estaban sobreexpresados. No se encontraron diferencias significativas en linfocitos NK.

DISCUSIÓN

A lo largo de esta Tesis Doctoral hemos abordado las bases moleculares de las NMP desde distintos puntos de vista. Por un lado, hemos evaluado la utilidad de la secuenciación de un panel de genes por NGS a la hora de diagnosticar y pronosticar las NMP. Nuestros hallazgos nos han permitido no solo identificar genes cuyas mutaciones tienen valor pronóstico sino también identificar nuevas variantes cuya caracterización aporta conocimiento sobre la biología de la enfermedad. La identificación de una familia con trombocitosis familiar nos animó además a buscar nuevas variantes implicadas en NMP familiares mediante secuenciación de exoma completo. Por último, decidimos caracterizar el haplotipo 46/1 de JAK2 mediante diversas técnicas y aproximaciones. Los estudios de conformación cromosómica nos permitieron identificar PD-L1 como un posible mecanismo a través del cual el haplotipo 46/1 de JAK2 media el incremento de riesgo de padecer NMP esporádicas. Todo esto nos permitirá plantear un modelo de enfermedad a lo largo de esta discusión.

I. UTILIDAD DE UN PANEL NGS DE GENES IMPLICADOS EN PATOLOGÍA MIELOIDE EN EL DIAGNÓSTICO DE LAS NMP

Aunque el valor de los paneles de NGS en el contexto clínico ha sido bastante estudiado en patologías como la Leucemia Mieloide Aguda y los Síndromes Mielodisplásicos¹⁵¹⁻¹⁵⁴, hay muy poca literatura sobre la contribución de paneles NGS en la asistencia diaria a pacientes con NMP. Los pocos artículos publicados al respecto se centran en el estudio de factores pronósticos y toma de decisiones terapéuticas¹⁵⁵.

El diagnóstico de las NMP es complejo ya que implica cumplir tanto criterios clínicos, analíticos y anatomopatológicos como moleculares^{1,2,9}. Aunque estos últimos no exigen la presencia de mutaciones en los genes *driver*, su ausencia complica mucho el diagnóstico y se recomienda la búsqueda de otros marcadores clonales para el diagnóstico de NMP triples negativas (NMP-TN)^{2,9}.

En nuestra serie, un 43% de las TE y un 23% de las MFP fueron TN y un 36% de las PV no presentaban mutaciones en JAK2. No es de extrañar, por tanto, que un 53.6% de nuestras peticiones especificasen la búsqueda de clonalidad y un 15.7% ayuda para la definición diagnóstica del paciente, haciendo un total de 69.3% de peticiones dirigidas

al diagnóstico y frente a un 30.7% para establecer un pronóstico (15%) o sospecha de progresión (15.7%). Además, la complejidad diagnóstica de estas entidades se muestra en que el diagnóstico definitivo fue de benignidad para un 23.6% de la cohorte. En cualquier caso, hay que reseñar que este panel se usa también en las sospechas de poliglobulias congénitas (genes EPOR, VHL, EPAS1 y EGLN1⁷⁸) lo cual ha podido incrementar el porcentaje de diagnósticos finales de benignidad.

Dentro del diagnóstico diferencial de las NMP se encuentran las causas secundarias de poliglobulia y trombocitosis^{1,2,5}. Del 23.6% de los pacientes diagnosticados de procesos benignos. Solamente un 54.5% presentaron variantes, la inmensa mayoría de ellas de significado incierto, es decir, probables polimorfismos de baja frecuencia, lo que contrasta con el 87.3% de pacientes con patología que sí presentaron variantes, la mayoría además con significado clínico, es decir, patogénicas o probablemente patogénicas. Esto resalta la importancia de la interpretación de las variantes a la hora de realizar un diagnóstico hematológico.

De los 5 pacientes con diagnóstico de benignidad y variantes con significado clínico, uno presentaba una mutación conocida en EPOR implicada en eritrocitosis familiar¹⁵⁶, otra una mutación de significado incierto en EGLN1, gen implicado en poliglobulia¹⁵⁷, otro una mutación de JAK2 L393V, presente en bases poblacionales y con una dudosa ganancia de función e implicación en eritrocitosis^{112,144} y otra mutaciones en FLT3 y SETBP1, pero descritas en bases poblacionales. Solamente una presentó una mutación descrita y de características patogénicas en SETBP1¹⁵⁸. Dicha paciente, aunque tras la realización del panel fue diagnosticada de un proceso benigno, desarrolló año y medio más tarde una Leucemia Mieloide Crónica Atípica.

Respecto a la búsqueda de clonalidad, esta se objetivó en un 69.2% de los casos que solicitaron el estudio de NGS con un objetivo diagnóstico. Si nos restringimos a aquellos casos que finalmente fueron diagnosticados de una neoplasia mieloide, se identificaron mutaciones en un 76.8% de los pacientes, aunque este porcentaje baja al 64.3% si nos quedamos sólo con aquellas de claro significado clínico. En el caso de las TE-TN, de gran dificultad diagnóstica, encontramos mutaciones en un 63.8% mientras que se detectaron mutaciones en todas las MFP-TN.

Todo esto pone de manifiesto la gran utilidad de la secuenciación de paneles de genes implicados en patología mieloide en el diagnóstico de las NMP y su alta rentabilidad a la hora de demostrar clonalidad, uno de sus criterios diagnósticos.

En nuestra serie, los genes más frecuentemente mutados y por tanto más útiles para la demostración de clonalidad fueron TET2 (17.3%), ASXL1 (16%), TP53 (6.2%) y CBL, EZH2 y DNMT3A (4.9%). La *European Leukemia Net* ya recomienda el estudio de los genes ASXL1, EZH2, IDH1/2 y SRSF2 en aquellas mielofibrosis sin mutaciones en los genes *driver* pero no hay consenso a la hora de estudiar otros genes como TP53, TET2, DNMT3A o CBL ni una recomendación de estudio de estos genes en TE^{9,76}. En cualquier caso, es probable que la indicación de estudios NGS en pacientes con NMP se amplíe conforme aumenten nuestros conocimientos sobre la influencia pronóstica de las mutaciones en genes no *driver*, como veremos a continuación.

2. PAPEL PRONÓSTICO DEL PERFIL MUTACIONAL EN LAS NMP

El valor pronóstico de las mutaciones en genes driver de NMP ha sido ampliamente estudiado^{17,75,159}.

La mutación V617F de JAK2 es la más frecuente tanto en TE como en PV y MFP^{10,14}. En TE se ha observado un aumento del riesgo de trombosis, lo que se ve reflejado en el score IPSET-Trombosis⁶⁶. Además, en MFP se asocia a una mayor cifra de hemoglobina, leucocitosis y edad^{17,159}. En cuanto a las mutaciones en el exón 12 de JAK2, exclusivas de PV, los pacientes que las presentan suelen ser más jóvenes al diagnóstico, con mayor hematocrito y menor cifra de leucocitos y plaquetas en comparación con los pacientes con V617F⁴⁰.

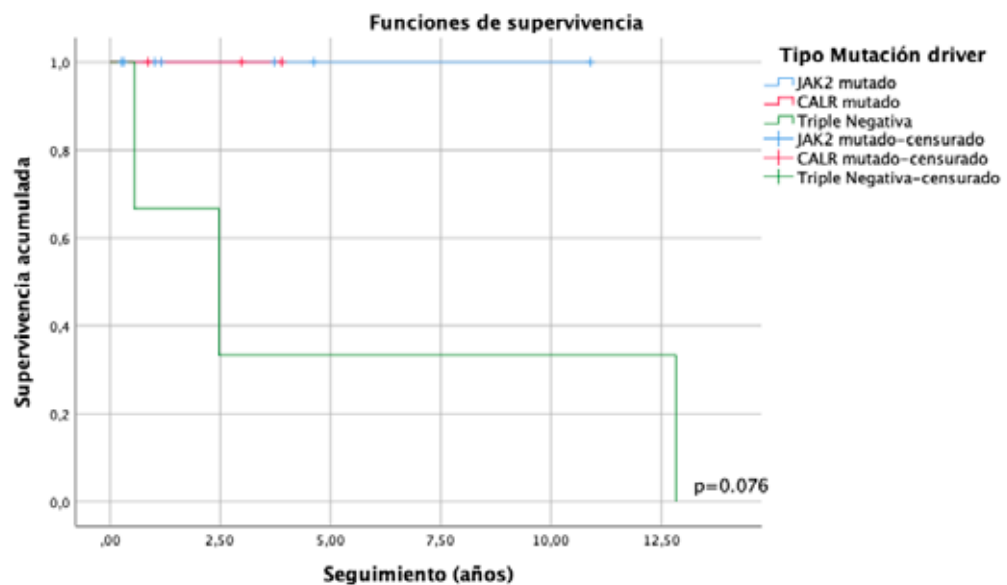
Si nos centramos en las mutaciones en CALR, presentes en TE y MFP, también encontramos influencia en el fenotipo y pronóstico de la enfermedad. En TE, las mutaciones en CALR se asocian a una mayor cifra de plaquetas y una menor edad al diagnóstico junto a una menor tasa de trombosis¹⁷. Esto ha hecho que la antiagregación en pacientes con TE y mutaciones en CALR no esté indicada en pacientes de riesgo bajo^{9,160}. En nuestra cohorte, se observa una asociación entre la presencia de mutaciones en CALR y progresión a mielofibrosis (un 81.8% progresaron vs un 46.2% de las JAK2 mutadas,

ninguna de las MPL positivas y un 6.7% de las triples negativas $p<0.001$) lo que está descrito en la literatura^{10,67,71,161}. En mielofibrosis, la presencia de mutaciones en CALR asocia un mejor pronóstico que aquellas MPL o JAK2 positivas y MFP TN, siendo este a expensas de las mutaciones tipo I de CALR^{27,43,70,72,162}. En nuestra pequeña cohorte de 22 MFP, tras una mediana de seguimiento de 2.48 años, 5 pacientes habían fallecido. De los mismos 1 presentaba mutaciones en JAK2 y 4 eran MFP triple negativas.

Respecto a las mutaciones en MPL, parece que están asociadas a una mayor progresión a mielofibrosis en TE aunque esto está pendiente de confirmación^{71,163,164}.

Por último, si nos centramos en las NMP-TN, la mediana de supervivencia de las MFP-TN fue de 2.48 años y no se alcanzó para el resto de pacientes (Figura 30, $p=0.076$). Aunque nuestra cohorte es demasiado pequeña para sacar conclusiones, nuestros resultados sí cuadran con la menos supervivencia descrita en las MFP triples negativas^{17,159}. Esto contrasta con excelente pronóstico de las TE TN, especialmente aquellas con 0-1 mutaciones, hasta el punto de que en dichos casos tal vez haya que replantearse el diagnóstico del paciente valorando de nuevo la posibilidad de una trombocitosis reactiva⁵⁷.

Figura 30.

Supervivencia global de MFP en función de mutaciones en genes *driver*

A toda la evidencia sobre las mutaciones *driver* se ha unido en los últimos años la importancia del valor pronóstico de las mutaciones en genes no *driver*^{13,14,44,53,54,56,165}, especialmente en mielofibrosis primaria, donde ya se utilizan diversos scores pronósticos^{26,27,31,55,166}. Un 59% de las TE, un 80% de las PV y un 82% de las MFP presentaron mutaciones no *driver*, lo que va en línea con trabajos publicados recientemente^{53,54}.

El corto seguimiento de los pacientes de nuestra cohorte (mediana 1.9 años), debido a que gran parte de los estudios se realizaron al diagnóstico y la relativa larga supervivencia de los pacientes con NMP, no permitieron sacar grandes conclusiones en cuanto a mortalidad. Sí merece la pena destacar que el único gen que se asoció a peor supervivencia, CBL, ha sido descrito en otros trabajos^{57,167} como factor de mal pronóstico y en la progresión a mielofibrosis y leucemia aguda secundaria, incluido el trabajo de Grinfeld

et al.⁵⁷, probablemente el más ambicioso y completo en cuanto al estudio de factores pronósticos genéticos, moleculares y clínicos en NMP.

En cuanto a progresión, tanto ASXL1 como TET2, asociados a progresión, son conocidos desde hace años como predictores de mal pronóstico^{53,54,56,57,76,165} y se recomienda el análisis de ASXL1 a la hora de decidir el trasplante hematopoyético en MFP⁹. Estas junto con las mutaciones en CALR^{57,73,161}, ya mencionadas anteriormente como asociadas a progresión a MFP en TE, fueron significativas en nuestra cohorte. En cuanto al número de mutaciones, varios trabajos han relacionado el número de mutaciones con progresión y mortalidad^{53,54,165,166}, algo que se replica en nuestro estudio. Tanto para TE como para TE-TN los resultados son similares a los de la cohorte completa aunque destaca la asociación de EZH2 y progresión en TE, ya descrita^{54,57}.

En la actualidad, solamente los *scores* pronósticos GIPSS²⁷, MIPSS70²⁶ y sus versiones MIPSS70-plus²⁶ y MIPSS70-plus 2.0³¹, utilizados en mielofibrosis, incluyen mutaciones (ASXL1, EZH2, IDH1, IDH2 y SRSF2, U2AF1 Q157 y ausencia de mutaciones tipo I de CALR). El grupo de Grinfeld et al.⁵⁷ sí ha trabajado en una clasificación molecular global de las NMP pero su modelo no ha sido validado en contexto clínico además de ser muy complejo. El análisis de nuestra cohorte corrobora estos resultados, aunque es curioso que ninguno de los *scores* arriba mencionados incluya TET2 entre sus variantes de riesgo, y resalta la importancia que las mutaciones en modificadores epigenéticos tienen en el pronóstico de la enfermedad. Se necesita el diseño de estudios con gran cantidad de pacientes dirigidos a desarrollar y validar clínicamente *scores* pronósticos simples que incluyan las mutaciones no *driver* en TE, PV y MFP.

3. TROMBOSIS: HEMATOPOYESIS CLONAL Y NMP

La hematopoyesis clonal de significado indeterminado (CHIP por sus siglas en inglés) fue descrita hace unos pocos años gracias a la realización estudios genéticos poblacionales a gran escala^{168,169}. Ésta puede definirse como la expansión de un clon con una mutación somática en personas sin una patología hematológica¹⁷⁰ siendo los genes más frecuentemente mutados DNMT3A, TET2 y ASXL1 (agrupados bajo el término genes DAT) y JAK2^{168,169}. La presencia de CHIP aumenta con la edad y no solamente incrementa la probabilidad de sufrir un cáncer hematológico sino también el riesgo cardiovascular^{168,169,171}. Se ha demostrado que las mutaciones en TET2 incrementan la inflamación lo que ayuda a progresar la aterosclerosis^{171,172}. Por tanto, la adquisición de mutaciones puede no solamente influir en el fenotipo de las NMP o en su progresión, como hemos visto previamente, sino también en el riesgo de sufrir un evento trombótico. Recordemos además que los eventos cardiovasculares son la principal causa de morbimortalidad en estos pacientes^{4,173}.

Debido a esto y dada la escasez de literatura al respecto^{174,175}, decidimos estudiar la relación entre el perfil mutacional y el riesgo trombótico tanto en la serie global como en los pacientes con NMP.

En la cohorte global, la presencia de mutaciones DAT y en concreto TET2 y DNMT3A se asociaron a trombosis, acorde con la literatura^{168,171}. En el estudio multivariante apareció también KMT2A, no descrito como gen frecuente en CHIP.

En cuanto a la serie de NMP, solamente se confirmó DNMT3A como gen de riesgo. Esto cuadra con los resultados del grupo de Cerquozzi et al¹⁷⁵ que no encontró asociación entre ASXL1 y TET2 y trombosis en PV (aunque no estudiaron DNMT3A). Otros estudios sí han encontrado asociación en NMP entre trombosis y presencia de mutaciones DAT o en TET2¹⁷⁴. En el grupo de TE, además, las mutaciones en CALR tipo I asociaron un mayor riesgo de trombosis, algo ya ha descrito⁷³.

En la actualidad, solamente el IPSET-Trombosis, aplicable a TE, utiliza marcadores moleculares (JAK2 V617F) para estratificar el riesgo trombótico en pacientes con NMP. Nuestros hallazgos apoyan la necesidad de realizar estudios muy amplios que definan el incremento del riesgo cardiovascular que las mutaciones no *driver* aportan en NMP y la necesidad o no de diseñar nuevos *scores* que cambien el manejo de estos pacientes. Es probable que las mutaciones en genes DAT deban ser incluidas en dichos *scores*.

Todos estos hallazgos ponen de manifiesto la utilidad de los paneles de NGS para establecer el diagnóstico y pronóstico de los pacientes con NMP. Además, nuestra serie, obtenida en el contexto asistencial, a pesar de su corto tamaño, es capaz de confirmar resultados ya expuestos en otros trabajos y no siempre congruentes entre artículos. La realización de estudios aún más grandes que los referenciados o meta-análisis de los mismos es necesaria para establecer definitivamente el papel de las mutaciones no *driver* en el diagnóstico, pronóstico y aproximación terapéutica de las NMP.

Por último, como veremos a continuación, los hallazgos obtenidos en paneles de genes mieloides utilizados en contexto clínico son capaces de aumentar también nuestro conocimiento sobre la biología de la enfermedad, la cual puede tener consecuencias sobre el fenotipo y complicaciones de los pacientes.

4. NUEVAS MUTACIONES: LECCIONES SOBRE LA BIOLOGÍA DE LA ENFERMEDAD

Gracias al desarrollo y mayor accesibilidad de las técnicas de secuenciación masiva, cada día se identifican nuevas mutaciones en los llamados genes *driver* de NMP (JAK2, CALR y MPL)^{148,176–180}. Como ya hemos comentado, en ocasiones es difícil definir si dichas mutaciones son pasajeras, (sin efecto en la enfermedad), polimorfismos de baja frecuencia o si son realmente causales del fenotipo del paciente. Por ello, consideramos indispensable la caracterización funcional de estas mutaciones, aunque ello requiera un esfuerzo a largo plazo y la colaboración entre distintos grupos científicos. En el caso de esta tesis se han caracterizado la doble mutación S505C/W515R de MPL y la mutación R683G de JAK2, pero consideramos que hay que comentar más extensamente algunas de las mutaciones descritas en la Tabla 15.

Las mutaciones en el codón 682 de JAK2 ya han sido descritas previamente en LLA-B y se encuentran dentro de las mutaciones implicadas en el fenotipo *Filadelfia-like*, de mal pronóstico^{142,143}. La mutación I682F se encuentra en el dominio JH2 que regula negativamente el dominio cinasa de JAK2 y algunos resultados sugieren que la mutación altera la estructura de este dominio permitiendo la activación anómala de JAK2¹⁸¹. Es curioso que tanto esta mutación como la R683G, que describiremos más adelante,

estén implicadas en tanto en la etiopatogenia de las leucemias linfoblásticas como en la de neoplasias de fenotipo mieloide. Es probable que todo dependa de la célula dónde se origine la mutación (célula madre hematopoyética o célula precursora mieloide versus célula precursora linfoide).

Otras mutaciones de JAK2 como T514R y D873A no han sido descritas previamente, teniendo esta última características patogénicas según el modelo predictivo de Polyphen-2. Otras como L393V^{144,145}, N1108S^{145,148,182} o K33T¹⁴⁶ son conocidas pero su patogenicidad no está completamente demostrada.

Respecto a CALR, es probable que las mutaciones de nuestra serie sean benignas salvo la ya conocida p.K368fs*51¹⁵⁰.

Por último, sería interesante caracterizar la mutación D261Y de MPL, probablemente patogénica, al igual que hemos hecho como la doble mutación S505C/W515R.

4.1 Las mutaciones en *cis* de MPL cooperan en la ganancia de función

Las mutaciones en el codón W515 de MPL en NMP fueron descritas por primera vez en 2006^{48,83}. Las más frecuentes son la W515L y la W515K siendo mucho más raras la W515R y la W515A¹⁸³⁻¹⁸⁵. El residuo W515 se encarga de fijar el dominio transmembrana en la membrana celular y sus mutaciones hacen que el receptor dimerizado se encuentre en conformación activa lo que hace que las células crezcan independientes de citoquinas y sean hipersensibles a la trombopoyetina^{186,187}. Mucho más rara es la mutación S505N, presente tanto en pacientes con NMP como en trombocitosis fami-

liares^{47,52}. Además, como hemos comentado, con la llegada de la NGS cada vez se están identificando más y más variantes raras de MPL implicadas en la etiopatogenia de las NMP^{148,176}.

Aunque ya se han descrito dobles mutantes en pacientes con NMP¹⁸⁸, hasta hace poco no se ha hecho un esfuerzo en describir el valor de la presencia de mutaciones en cis en este gen^{189,190}. Además, la mutación S505C/W515R nunca había sido descrita por lo que nos decidimos a caracterizarla.

Como se extrae de nuestros resultados, la mutación S505C, inocua por sí sola, aumenta la actividad constitucional y la hipersensibilidad a trombopoyetina del MPL W515 mutado. Esto implica un aumento en la capacidad proliferativa de las células mutadas, modificando la biología de la enfermedad. Nuestros hallazgos aumentan la evidencia de que determinadas combinaciones de mutaciones modifican la actividad de MPL y nos ayuda a entender los mecanismos que producen y ayudan a progresar las enfermedades MPL positivas.

5. LA MUTACIÓN GERMINAL R683G DE JAK2 COMO CAUSA DE UNA TROMBOCITOSIS FAMILIAR AGRESIVA: PAPEL DE LA ACTIVIDAD CONSTITUCIONAL

El análisis de las mutaciones encontradas dentro del proceso asistencial no sólo nos permite profundizar nuestro conocimiento de la biología de las NMP esporádicas sino también la de síndromes hereditarios parecidos a las NMP (NMP-*like*) como las trombocitosis familiares.

En total se identificaron 5 pacientes portadores de la mutación R683G de JAK2, todos de la misma familia. De estos, los 4 adultos requirieron esplenectomía debido a esplenomegalias masivas y tres de ellos sufrieron eventos trombóticos graves (dos trombosis portales y mesentéricas y un tromboembolismo pulmonar), falleciendo uno de ellos. Todos los pacientes se encuentran en la actualidad en tratamiento con anagrelide por intolerancia a la hidroxycarbamida salvo el menor de edad que persiste en tratamiento con hidroxycarbamida.

Aunque hace más de 20 años que las mutaciones en el gen de la trombopoyetina (TPO)¹⁹¹ se describieron como causa de trombocitosis familiares, no fue hasta principios de siglo cuando se describieron las primeras mutaciones en genes *driver* de NMP^{52,78}.

Desde el año 2012 se han descrito 13 mutaciones (Tabla 21) causantes de trombocitosis hereditaria en el gen JAK2. La mayoría de estas comentan casos aislados de trombocitosis sin presencia de esplenomegalia y solamente unos pocos cuentan historia de trombosis.

Tabla 21.

Relación de mutaciones germinales de JAK2 causantes de Trombocitosis Familiares descritas en la literatura.

Modificada y actualizada de Rumi et al (2017)⁷⁸.

MUTACIONES GERMINALES DE JAK2 DESCRITAS EN TROMBOCITOSIS FAMILIARES	
MUTACIÓN	REFERENCIA
V617I	Mead et al (2012) ¹¹⁵
H608N	Rumi et al (2014) ¹⁹²
R867Q, S755R/R938Q	Marty et al (2014) ¹⁹³ , Maie et al (2018) ¹⁹⁴
R564Q	Etheridge et al (2014) ¹⁹⁵
G335D, F556V, V625F, G571S	Milosevic Feenstra et al (2016) ¹⁷⁶
N1108S	Cabagnols et al (2016) ¹⁴⁸
E846D, R1063H	Kapralova et al (2016) ¹⁹⁶
T875N	Yoshimitsu et al (2019) ¹⁹⁷

La mutación R683G se conoce desde hace años en casos de leucemia linfoblástica B infantil, estando presente en cerca de un 10% de los casos de LLA-B de alto riesgo¹⁹⁸ y en torno a un 20% de las LLA-B asociadas a síndrome de Down¹⁹⁹. El residuo

R683 se encuentra en el dominio pseudocinasa de JAK2. Este dominio, donde también se encuentra el codón 617, se encarga de regular la activación del dominio cinasa de JAK2 y diversos modelos basados en cristalografía de proteínas sugieren que la mutación R683G altera la interacción entre estos dos dominios y produce la activación constitutiva de JAK2^{200–202}.

Solamente se ha descrito la mutación en dos ocasiones en contexto de neoplasias mieloides, en el año 2018 en un caso del TE en la serie de Grinfeld⁵⁷ y el año pasado en uno de leucemia mieloide aguda relacionado con síndrome de Down²⁰³. La familia que describimos es la primera que presenta esta mutación de manera germinal y además padece un fenotipo muy agresivo en la forma de esplenomegalia masiva y trombosis. Esta agresividad puede estar relacionada con la gran actividad constitutiva de JAK2 R683G. Por ejemplo, los pacientes con la mutación V617I que no presenta actividad independiente de citoquinas o aquellos con la mutación R564Q, que tiene menor efecto sobre el crecimiento celular que JAK2 V617F, no presentan esplenomegalia^{115,195}. De hecho, solamente la mutación R867Q y la doble mutación E846D y R1063H se asocian a esplenomegalia leves^{193,196}. Todo esto contrasta con la mutación germinal MPL S505N, cuya actividad se demostró independiente de citoquinas en estudios de proliferación y cuyos pacientes sí presentan esplenomegalia, aunque no tan marcada como la familia que describimos^{52,204}.

6. LAS NMP FAMILIARES: UNA CAUSALIDAD DIFÍCIL DE DEMOSTRAR

Dados nuestros hallazgos en el caso de la trombocitosis familiar JAK2 R683G, decidimos seguir indagando en la herencia de las NMP, primero en las NMP familiares y posteriormente en la predisposición genética a padecer NMP esporádicas.

Como se ha comentado ya en la introducción, hay muy pocos trabajos publicados que muestren mutaciones causales de NMP familiares. Estas entidades presentan una herencia autosómica dominante con penetrancia variable y es realmente difícil demostrar la causalidad de las mutaciones encontradas⁷⁸.

En nuestro caso, identificamos dos familias con seguimiento en nuestras consultas. De éstas, tal y como puede observarse en el árbol genético, la familia 1 presenta una alta penetrancia. A pesar de ello y restringiendo mucho los criterios de filtrado de variantes, no encontramos candidatos claros que expliquen la aparición de la mutación V617F en estos pacientes y su progresión a una NMP. MUTYH está implicado en la reparación del DNA, en concreto en los cambios erróneos de G:C por T:A como el que ocurre en el caso de la V617F^{205,206}. Sin embargo, se trata de un gen relativamente frecuente en poliposis familiar y no hay descrita su asociación con NMP²⁰⁵. Otros genes de interés podrían ser EPHA2, una tirosina cinasa implicada en la etiopatogenia de tumores

sólidos²⁰⁷ o DYRK1B, implicado en el ciclo celular²⁰⁸. En la familia 2, con menor penetrancia, podrían ser relevantes el regulador epigenético EHMT2^{209,210}, implicado en proliferación y en la regulación de p53 o algunos genes implicados en el sistema inmune e inflamación como pueden ser TRIM15^{211,212} o NLRP6²¹³.

Esta limitación se observa también en los estudios presentes en la literatura^{64,85-87}. La mutación E208 en SH2B3, un regulador negativo de la vía JAK-STAT, no segrega completamente con la enfermedad^{64,87} a pesar de estar demostrado que incrementan la señalización JAK-STAT⁸⁸. RBBP6 ubiquitina y degrada p53 pero no se ha demostrado el efecto de sus mutaciones teniendo estas en cualquier caso muy baja penetrancia⁸⁶. Solamente son convincentes los resultados de Saliba et al.⁸⁵ con una alta penetrancia entre los sujetos con la duplicación de ATG2B y GSKIP y la demostración de que la sobreexpresión de estos genes incrementa la sensibilidad a trombopoyetina.

Todo esto pone de manifiesto que para identificar genes implicados en la etiopatogenia de NMP familiares se necesitan: 1) pedigrís muy amplios que permitan reducir el número de variantes candidatas y 2) realizar un gran esfuerzo para la caracterización de las mutaciones.

7. HAPLOTIPO 46/I DE JAK2: EL PAPEL DE LAS REGIONES REGULADORAS

Tras haber ahondado en las bases moleculares de los síndromes NMP-*like* y de las NMP familiares, decidimos centrarnos en la herencia genética de las NMP esporádicas, en concreto en el haplotipo 46/1 de JAK2. Como se ha comentado en la introducción de esta tesis, este haplotipo aporta cerca del 30%^{82,94,214} del riesgo de padecer una NMP JAK2 positiva y se ha asociado también, aunque de manera más dudosa, a padecer NMP JAK2 negativas^{98,107,215}. A pesar de haber sido descrito hace ya más de 10 años todavía no se conoce como media su efecto sin haberse descrito cambios en el fenotipo de los portadores (p.e. un aumento de los niveles de hemoglobina o número de plaquetas) o en la expresión de genes^{94,98,215,216}. A todo esto se suma la dificultad de demostrar la hipótesis de la hipermutabilidad^{34,82}.

No es de extrañar, por tanto, que no encontrásemos diferencias significativas en las características clínicas y analíticas de los pacientes. El hallazgo de un aumento de la ratio monocito/linfocito en aquellos participantes del Estudio PESA homocigotos para el haplotipo 46/1 podría tratarse de un hallazgo incidental. Sin embargo, recientemente se ha empezado a considerar esta ratio como un marcador de inflamación, teniendo además valor pronóstico en enfermedades cardiovasculares, oncológicas, autoinmunes e infecciosas²¹⁷⁻²²⁰.

En esa dirección van los resultados obtenidos del RNA-seq del PESA, donde se observa a grandes rasgos un aumento de genes de línea mieloide y una disminución de genes de línea linfóide como puede observarse en la Figura 25. Por supuesto, estos resultados han de tomarse con cautela ya que ningún gen resultó significativo tras ajustar por comparación múltiple. No hay que olvidar, además, que el estudio PESA y la selección de los pacientes con transcriptómica y proteómica están dirigidos a buscar diferencias entre participantes con distintos enfermedad aterosclerótica²²¹.

A lo largo de los últimos años, numerosos GWAS (*genome wide association studies*) han identificado polimorfismos de un solo nucleótido (SNP por sus siglas en inglés) asociados a distintos rasgos y enfermedades⁸⁹. Sin embargo, los SNPs asociados no tienen por qué ser los que medien este efecto (pueden ser otras secuencias en desequilibrio de ligamiento con el SNP) y además la mayoría de SNPs no se encuentran en regiones codificantes sino en regiones con potencial regulatorio¹²¹⁻¹²³.

Debido a esto decidimos estudiar la estructura tridimensional, es decir, las interacciones, del haplotipo 46/1 con dos objetivos: 1) investigar si el plegamiento de la región es muy distinto entre haplotipos, lo que podría afectar a la mutagénesis del locus de JAK2 y 2) descubrir interacciones que nos permitiesen descubrir genes diferencialmente expresados y establecer nuevas hipótesis sobre la causalidad del haplotipo.

El modelado tridimensional del haplotipo no resultó informativo, probablemente debido a la poca distancia entre *viewpoints* en comparación con otros estudios donde este método fue utilizado^{137,138}. En cualquier caso, no parece que las diferencias en el plegamiento sean lo suficientemente marcadas como para influir en la mutagénesis de JAK2^{222,223}.

Los experimentos 4C-seq sí nos dieron sin embargo una información cualitativa de gran valor, ya que observamos interacciones entre el locus del haplotipo de JAK2 y las regiones promotoras de PD-L1, PD-L2 y KIAA1432 (Figura 26). Puede sorprender que el haplotipo interactúe con una región tan lejana (500kb), sin embargo, los *enhancers* a larga distancia ya han sido previamente descritos²²⁴ y nuestros resultados muestran interacciones aún más largas (SMARCA2 está a 3000kb de distancia).

Además, estas interacciones parecen confirmarse por las diferencias en la expresión en individuos sanos de los genes JAK2 y PD-L2, pero sobretodo de PD-L1, en función del haplotipo y tipo celular. PD-L1, como veremos a continuación, juega un papel clave en la regulación del sistema inmune e involucra de lleno al haplotipo 46/1 de JAK2 en la inmunidad e inflamación, procesos clave en la etiopatogenia de las NMP.

8. INFLAMACIÓN E INMUNIDAD: EL POSIBLE PAPEL DE PD-L1 EN LA ETIOPATOGENIA DE LAS NMP

Es sabido que en la etiopatogenia de todas la neoplasias, pero en particular en la de las NMP, el sistema inmune y la inflamación juegan un papel central tanto en su iniciación como en su progresión³³. Los síntomas constitucionales, la esplenomegalia y la mieloproliferación, signos y síntomas característicos de las NMP, aparecen en otros cuadros inflamatorios crónicos y en el caso de NMP sin clonalidad se deben excluir otras causas^{2,33}. El TNF- α una citoquina proinflamatoria, se encuentra elevada en pacientes con NMP junto a otras citoquinas y su presencia es fundamental para la progresión de la enfermedad²²⁵. También se ha demostrado que las células tumorales son capaces de estimular la producción de citoquinas proinflamatoria por parte de las células normales²²⁶. Además, los niveles de determinadas interleuquinas son factor pronóstico adverso en MFP²²⁷ y el tratamiento con el inhibidor de JAK ruxolitinib, que disminuye la esplenomegalia y síntomas constitucionales de los pacientes con MFP, disminuye los niveles de citoquinas inflamatorias, lo que se correlación con la respuesta²²⁸. Por otro lado, el interferón- $\alpha 2$, de los pocos tratamientos que consigue remisiones completas duraderas en pacientes con NMP, media su efecto no solo actuando directamente contra las células tumorales²²⁹ sino también actuando como inmunomodulador^{230–232}.

El eje PD-1/PD-L1 es una ruta clave para la regulación del sistema inmune²³³. PD-1 se expresa fundamentalmente en linfocitos T aunque se encuentra también en linfocitos B y NK, monocitos y células presentadoras de antígenos. PD-L1, sin embargo, se expresa en casi todos los tipos celulares al contrario que PD-L2 que está presente de manera casi exclusiva en las células presentadoras de antígenos^{234–237}. La unión de PD-1 a sus ligandos inhibe la proliferación de células T, induce apoptosis y promueve la diferenciación de células T CD4+ hacia un fenotipo regulador^{234,235}. Aunque la función de este eje es impedir una activación excesiva del sistema inmune (por ejemplo, ratones sin PD-L1 desarrolla enfermedades autoinmunes²³⁸) en los últimos años se ha demostrado que los tumores utilizan la sobreexpresión de PD-L1 como mecanismo de escape inmunológico^{233,239}. Debido a esto se han desarrollado anticuerpos anti PD-L1 y PD-1 que ya se utilizan en el tratamiento del linfoma de Hodgkin, melanomas y cáncer de pulmón entre otros^{233,235}.

Un trabajo reciente ha demostrado que JAK2 V617F aumenta la expresión de PD-L1 a través de la fosforilación de STAT3 y STAT5, factores de transcripción diana de JAK2²⁴⁰. Este aumento de expresión de PD-L1 se observó en linfocitos T, monocitos, plaquetas y células supresoras derivadas mieloides (MDSC por sus siglas en inglés). Además, demostraron que ratones transgénicos con la mutación V617F de JAK2 y ratones con xenoinjertos de pacientes presentaban mejor supervivencia con tratamiento anti PD-1. Esta respuesta está mediada por linfocitos T, los cuales vieron afectado su metabolismo y ciclo celular en contacto con células V617F positivas²⁴⁰. La conclusión de este trabajo fue que PD-L1 media el escape inmunológico y progresión de las células JAK2 V617F positivas. Esta no es la única evidencia de la interacción entre JAK2 y PD-L1 ya que este mismo año se ha descrito que INCR1, un *long non-coding RNA* (un RNA largo no codificante, lncRNA por sus siglas en inglés) cuya expresión se estimula en presencia

de INF- γ , aumenta la expresión de JAK2 y PD-L1 en células tumorales, promoviendo su proliferación y escape inmune²⁴¹.

En cualquier caso, estos estudios se centran en la expresión de PD-L1 por parte de las células tumorales, no por parte del sistema inmune encargado de eliminar los clones tumorales. Se sabe que en pacientes con NMP, los niveles de PD-1/PD-L1 están aumentados no solo en células CD34+ sino también en linfocitos T CD4+ y CD8+²⁴². Otro grupo ha mostrado que se encuentran elevados también en linfocitos B y que sus niveles cambian con el tratamiento²⁴³.

Aunque hay muy poco publicado al respecto, ya hay trabajos que muestran el mal pronóstico de un aumento de linfocitos T PD-L1 positivos en cáncer de pulmón y melanoma^{244,245}. Además, muy recientemente se ha publicado un sólido trabajo que muestra que las células T PD-L1+ promueven la tolerancia al tumor mediante varios mecanismos, entre ellos bloqueando la activación y promoviendo la diferenciación Th17 de linfocitos T CD4+, inhibiendo la activación de células T citotóxicas y promoviendo una diferenciación tolerogénica de macrófagos, todo ello permitiendo la progresión tumoral²⁴⁶.

Todo esto nos permite plantear un modelo de enfermedad en el cuál una vez el individuo adquiere la mutación en V617F de JAK2 la disregulación inmune secundaria al aumento de expresión linfocitaria de PD-L1 facilita la progresión del clon JAK2 positivo y el desarrollo de la neoplasia mieloproliferativa. La aparente susceptibilidad a infecciones en portadores¹⁰⁸, la menor clínica constitucional en homocigotos^{106,107}, la progresión más rápida de la carga tumoral en pacientes con PV sin tratamiento¹⁰⁵ y una mayor VAF de JAK2 en pacientes con NMP cuando éstos presentan el haplotipo en homocigosis apoyan este modelo^{107,247}. Los próximos pasos para confirmar nuestros hallazgos deberán ir

dirigidos a: 1) confirmar la alteración de niveles de PD-L1 en pacientes con NMP en función del haplotipo; 2) determinar mediante técnicas como las CRISP/Cas9 o ensayos de reporteros qué región o SNPs del haplotipo regulan diferencialmente la expresión de PD-L1 y 3) usar modelos animales de NMP para demostrar que el tratamiento con anti PD-1/ anti PD-L1 retrasa la aparición de la enfermedad una vez se adquiere la mutación.

9. INTEGRANDO UN MODELO DE ENFERMEDAD: HERENCIA, INMUNIDAD Y ADQUISICIÓN DE MUTACIONES

Los resultados obtenidos en esta tesis nos permiten formular un modelo de enfermedad en el que la herencia genética, la inflamación e inmunidad y el perfil de mutaciones somáticas explican el inicio, progresión y complicaciones de las NMP, es decir, su historia natural^{14,34,248} (Figura 31).

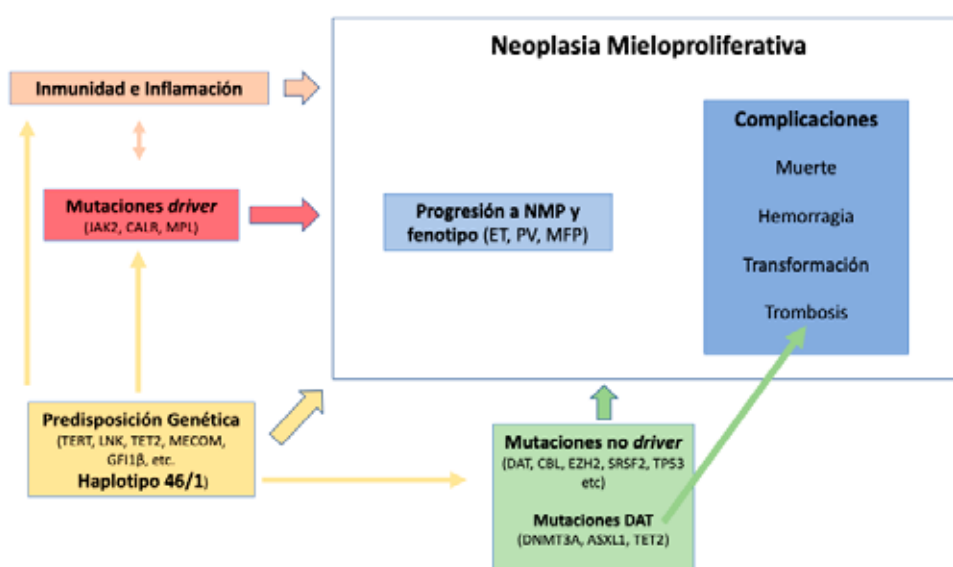
En este, el individuo adquiere una mutación, la mayoría de las veces en un gen *driver* (recordemos por ejemplo que la mutación V617F de JAK2 está presente en la población general^{92,168}). La adquisición de esta mutación puede estar influida por factores genéticos heredados (mutaciones en genes de reparación o epigenéticos, etc.⁹⁰⁻⁹²) o factores adquiridos como un estado inflamatorio²⁴⁹ o la edad¹⁴.

Una vez adquirida la mutación, el clon progresa hasta producirse la enfermedad, ya sea por selección clonal o adquisición de nuevas mutaciones. Estas nuevas mutaciones, además de otras variantes heredadas, pueden modificar el fenotipo de la enfermedad^{14,34}. Es en esta fase donde la inflamación y la inmunidad, influida por factores genéticos como el haplotipo 46/1 y su alteración de los niveles de PD-L1, puede jugar un papel importante.

Por último, todos estos factores participan en las complicaciones de la enfermedad, ya sea progresión a mielofibrosis, transformación a leucemia aguda, trombosis, hemorragias o mortalidad. El papel de cada uno de estos factores, como por ejemplo la inflamación en la fibrosis^{33,250}, las mutaciones en TP53, ASXL1 o SRSF2 en la leucemogénesis^{14,167} o si los mecanismos por los que las mutaciones en genes DAT promueven la trombosis son los mismos que los de la hematopoyesis clonal^{171,172} deben ser estudiados con grandes series de pacientes, modelos animales y nuevas aproximaciones experimentales. Un conocimiento más profundo de estos y más aspectos de la biología de la enfermedad nos permitirá mejorar los criterios diagnósticos, desarrollar algoritmos pronósticos y terapéuticos e identificar dianas terapéuticas que mejorarán la calidad y esperanza de vida de nuestros pacientes.

Figura 31.

Modelo de etiopatogenia de las Neoplasias Mieloproliferativas



CONCLUSIONES

1. La secuenciación de genes implicados en patología mieloide por NGS tiene utilidad diagnóstica y pronóstica en pacientes con neoplasias mieloproliferativas. La interpretación de las distintas variantes encontradas y su caracterización funcional es clave en este proceso.
2. El perfil mutacional de las neoplasias mieloproliferativas influye en su pronóstico. CBL se asoció a menor supervivencia. Las mutaciones en tirosinas cinasas y sus rutas (en concreto la mutación driver tipo I de CALR) y en genes modificadores epigenéticos (ASXL1 y TET2 y DAT) se asociaron a progresión, al igual que un mayor número de mutaciones.
3. Nuestros resultados sugieren que las mutaciones DAT incrementan el riesgo trombótico no sólo en población general sino también en pacientes con NMP. Nuestra serie sólo encontró asociación significativa entre trombosis y DNMT3A precisándose cohortes más amplias y meta-análisis para confirmar estos hallazgos.
4. Las dobles mutaciones de MPL son capaces de modificar la biología de la enfermedad. La mutación germinal R683G de JAK2 ocasiona una trombocitosis familiar agresiva.
5. La herencia en las neoplasias mieloproliferativas familiares es compleja y la identificación de las variantes causales precisa de pedigrís amplios y la caracterización funcional de dichas mutaciones.

6. El estudio de la estructura tridimensional del genoma puede ayudarnos a explicar los mecanismos por los cuales variantes de riesgo de padecer enfermedades median sus efectos.

7. El haplotipo 46/1 de JAK2 media sus efectos, al menos en parte, a través de la sobreexpresión de PD-L1 en linfocitos. Es muy probable que esta sobreexpresión promueva la tolerancia tumoral permitiendo la progresión tumoral una vez se adquiere la mutación V617F de JAK2.

BIBLIOGRAFÍA

1. Swerdlow S, Campo E, Harris N, et al. WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues. IARC; 2017.
2. Arber D, Orazi A, Hasserjian R, et al. The 2016 revision to the World Health Organization classification of myeloid neoplasms and acute leukemia. *Blood*. 2016;127(20):2391–4205.
3. Moulard O, Mehta J, Fryzek J, et al. Epidemiology of myelofibrosis, essential thrombocythemia, and polycythemia vera in the European Union. *Eur. J. Haematol*. 2014;92(4):289–297.
4. Rumi E, Cazzola M. Diagnosis, risk stratification, and response evaluation in classical myeloproliferative neoplasms. *Blood*. 2017;129(6):680–692.
5. Besses C, Cervantes F. Manual de Recomendaciones en Neoplasias mieloproliferativas crónicas Filadelfia negativas. Grupo Español de Neoplasias Mieloproliferativas Crónicas Filadelfia Negativas; 2016.
6. Jabbour E, Kantarjian H. Chronic myeloid leukemia: 2020 update on diagnosis, therapy and monitoring. *Am. J. Hematol*. 2020;95(6):691–709.
7. Hochhaus A, Baccarani M, Silver RT, et al. European LeukemiaNet 2020 recommendations for treating chronic myeloid leukemia. *Leukemia*. 2020;34(4):966–984.
8. Chereda B, Melo J V. Natural course and biology of CML. *Ann. Hematol*. 2015;94(2):107–121.

9. Barbui T, Tefferi A, Vannucchi AM, et al. Philadelphia chromosome-negative classical myeloproliferative neoplasms: Revised management recommendations from European LeukemiaNet. *Leukemia*. 2018;32(5):1057–1069.
10. Rumi E, Cazzola M. Diagnosis , risk stratification , and response evaluation in classical myeloproliferative neoplasms. 2019;129(6):680–693.
11. Johansson P. Epidemiology of the myeloproliferative disorders polycythemia vera and essential thrombocythemia. *Semin. Thromb. Hemost.* 2006;32(3):171–173.
12. Tefferi A, Rumi E, Finazzi G, et al. Survival and prognosis among 1545 patients with contemporary polycythemia vera: An international study. *Leukemia*. 2013;27(9):1874–1881.
13. Tefferi A, Barbui T. Polycythemia vera and essential thrombocythemia: 2019 update on diagnosis, risk-stratification and management. *Am. J. Hematol.* 2019;94(1):133–143.
14. Vainchenker W, Kralovics R. Genetic basis and molecular pathophysiology of classical myeloproliferative neoplasms. *Blood*. 2017;129(6):667–679.
15. Marchioli R, Finazzi G, Landolfi R, et al. Vascular and neoplastic risk in a large cohort of patients with polycythemia vera. *J. Clin. Oncol.* 2005;23(10):2224–2232.
16. Elliott MA, Tefferi A. Thrombosis and haemorrhage in polycythaemia vera and essential thrombocythaemia. *Br. J. Haematol.* 2005;128(3):275–290.

17. Tefferi A, Guglielmelli P, Larson DR, et al. Long-term survival and blast transformation in molecularly annotated essential thrombocythemia, polycythemia vera, and myelofibrosis. *Blood*. 2014;124(16):2507–2513.
18. Marchetti M, Ghirardi A, Masciulli A, et al. Second cancers in MPN: Survival analysis from an international study. *Am. J. Hematol*. 2020;95(3):295–301.
19. Hultcrantz M, Kristinsson SY, Andersson TML, et al. Patterns of survival among patients with myeloproliferative neoplasms diagnosed in Sweden from 1973 to 2008: A population-based study. *J. Clin. Oncol*. 2012;30(24):2995–3001.
20. Finazzi G, Harrison C. Essential thrombocythemia. *Semin. Hematol*. 2005;42(4):230–238.
21. Finazzi G, Carobbio A, Thiele J, et al. Incidence and risk factors for bleeding in 1104 patients with essential thrombocythemia or prefibrotic myelofibrosis diagnosed according to the 2008 WHO criteria. *Leukemia*. 2012;26(4):716–719.
22. Barbui T, Thiele J, Passamonti F, et al. Survival and disease progression in essential thrombocythemia are significantly influenced by accurate morphologic diagnosis: A international study. *J. Clin. Oncol*. 2011;29(23):3179–3184.
23. Takaishi K, Takeuchi M, Tsukamoto S, et al. Suppressive effects of anagrelide on cell cycle progression and the maturation of megakaryocyte progenitor cell lines in human induced pluripotent stem cells. *Haematologica*. 2020;105(5):E216–E220.

24. Tefferi A, Guglielmelli P, Pardanani A, Vannucchi AM. Myelofibrosis Treatment Algorithm 2018. *Blood Cancer J.* 2018;8(8).
25. Thiele J, Kvasnicka HM, Müllauer L, et al. Essential thrombocythemia versus early primary myelofibrosis: A multicenter study to validate the WHO classification. *Blood.* 2011;117(21):5710–5718.
26. Guglielmelli P, Lasho TL, Rotunno G, et al. MIPSS70: Mutation-enhanced international prognostic score system for transplantation-age patients with primary myelofibrosis. *J. Clin. Oncol.* 2018;36(4):310–318.
27. Tefferi A, Guglielmelli P, Nicolosi M, et al. GIPSS: Genetically inspired prognostic scoring system for primary myelofibrosis. *Leukemia.* 2018;32(7):1631–1642.
28. Cervantes F, Dupriez B, Pereira A, et al. New prognostic scoring system for primary myelofibrosis based on a study of the International working group for myelofibrosis research and treatment. *Blood.* 2009;113(13):2895–2901.
29. Gangat N, Caramazza D, Vaidya R, et al. DIPSS plus: A refined dynamic international prognostic scoring system for primary myelofibrosis that incorporates prognostic information from karyotype, platelet count, and transfusion status. *J. Clin. Oncol.* 2011;29(4):392–397.
30. Passamonti F, Cervantes F, Vannucchi AM, et al. A dynamic prognostic model to predict survival in primary myelofibrosis: A study by the IWG-MRT (International Working Group for Myeloproliferative Neoplasms Research and Treatment). *Blood.* 2010;115(9):1703–1708.

31. Tefferi A, Guglielmelli P, Lasho TL, et al. MIPSS701 version 2.0: Mutation and karyotype-enhanced international prognostic scoring system for primary myelofibrosis. *J. Clin. Oncol.* 2018;36(17):1769–1770.
32. Tefferi A. Primary myelofibrosis: 2019 update on diagnosis, risk-stratification and management. *Am. J. Hematol.* 2018;93(12):1551–1560.
33. Koschmieder S, Mughal TI, Hasselbalch HC, et al. Myeloproliferative neoplasms and inflammation: Whether to target the malignant clone or the inflammatory process or both. *Leukemia.* 2016;30(5):1018–1024.
34. Jones A V., Cross NCP. Inherited predisposition to myeloproliferative neoplasms. *Ther. Adv. Hematol.* 2013;4(4):237–253.
35. Nangalia J, Green AR. Myeloproliferative neoplasms: From origins to outcomes. *Hematology.* 2017;2017(1):470–479.
36. Levine RL, Wadleigh M, Cools J, et al. Activating mutation in the tyrosine kinase JAK2 in polycythemia vera, essential thrombocythemia, and myeloid metaplasia with myelofibrosis. *Cancer Cell.* 2005;7(4):387–397.
37. Baxter EJ, Scott LM, Campbell PJ, et al. Acquired mutation of the tyrosine kinase JAK2 in human myeloproliferative disorders. *Lancet.* 2005;365(9464):1054–1061.
38. Kralovics R, Passamonti F, Buser AS, et al. A Gain-of-Function Mutation of JAK2 in Myeloproliferative Disorders Robert. *NEJM.* 2005;1779–1790.

39. Scott LM, Tong W, Levine RL, et al. JAK2 exon 12 mutations in polycythemia vera and idiopathic erythrocytosis. *N. Engl. J. Med.* 2007;356(5):459–468.
40. Scott LM. The JAK2 exon 12 mutations: A comprehensive review. *Am. J. Hematol.* 2011;86(8):668–676.
41. Ugo V, Marzac C, Teyssandier I, et al. Multiple signaling pathways are involved in erythropoietin-independent differentiation of erythroid progenitors in polycythemia vera. *Exp. Hematol.* 2004;32(2):179–187.
42. Leroy E, Dusa A, Colau D, et al. Uncoupling JAK2 V617F activation from cytokine-induced signalling by modulation of JH2 α C helix. *Biochem. J.* 2016;473(11):1579–1591.
43. Klampfl T, Gisslinger H, Harutyunyan AS, et al. Somatic mutations of calreticulin in myeloproliferative neoplasms. *N. Engl. J. Med.* 2013;369(25):2379–2390.
44. Nangalia J, Massie CE, Baxter EJ, et al. Somatic CALR mutations in myeloproliferative neoplasms with nonmutated JAK2. *N. Engl. J. Med.* 2013;369(25):2391–2405.
45. Chachoua I, Pecquet C, El-Khoury M, et al. Thrombopoietin receptor activation by myeloproliferative neoplasm associated calreticulin mutants. *Blood.* 2016;127(10):1325–1335.
46. Pecquet C, Chachoua I, Roy A, et al. Calreticulin mutants as oncogenic rogue chaperones for TpoR and traffic-defective pathogenic TpoR mutants. *Blood.* 2019;133(25):2669–2681.

47. Beer PA, Campbell PJ, Scott LM, et al. MPL mutations in myeloproliferative disorders: Analysis of the PT-1 cohort. *Blood*. 2008;112(1):141–149.
48. Pikman Y, Lee BH, Mercher T, et al. MPLW515L is a novel somatic activating mutation in myelofibrosis with myeloid metaplasia. *PLoS Med*. 2006;3(7):1140–1151.
49. Pardanani AD, Levine RL, Lasho T, et al. MPL515 mutations in myeloproliferative and other myeloid disorders: A study of 1182 patients. *Blood*. 2006;108(10):3472–3476.
50. Cabagnols X, Favale F, Pasquier F, et al. Presence of atypical thrombopoietin receptor (MPL) mutations in triple-negative essential thrombocythemia patients. *Blood*. 2016;127(3):333–342.
51. Defour JP, Chachoua I, Pecquet C, Constantinescu SN. Oncogenic activation of MPL/thrombopoietin receptor by 17 mutations at W515: Implications for myeloproliferative neoplasms. *Leukemia*. 2016;30(5):1214–1216.
52. Ding J, Komatsu H, Wakita A, et al. Familial essential thrombocythemia associated with a dominant-positive activating mutation of the c-MPL gene, which encodes for the receptor for thrombopoietin. *Blood*. 2004;103(11):4198–4200.
53. Tefferi A, Lasho TL, Finke CM, et al. Targeted deep sequencing in primary myelofibrosis. *Blood Adv*. 2016;1(2):105–111.
54. Tefferi A, Lasho TL, Guglielmelli P, et al. Targeted deep sequencing in polycythemia vera and essential thrombocythemia. *Blood Adv*. 2016;1(1):21–30.

55. Vannucchi AM, Lasho TL, Guglielmelli P, et al. Mutations and prognosis in primary myelofibrosis. *Leukemia*. 2013;27(9):1861–1869.
56. Tefferi A, Guglielmelli P, Lasho TL, et al. CALR and ASXL1 mutations-based molecular prognostication in primary myelofibrosis: An international study of 570 patients. *Leukemia*. 2014;28(7):1494–1500.
57. Grinfeld J, Nangalia J, Baxter EJ, et al. Classification and personalized prognosis in myeloproliferative neoplasms. *N. Engl. J. Med.* 2018;379(15):1416–1430.
58. Rampal R, Ahn J, Abdel-Wahaba O, et al. Genomic and functional analysis of leukemic transformation of myeloproliferative neoplasms. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2014;111(50):E5401–E5410.
59. Passamonti F, Rumi E, Pietra D, et al. A prospective study of 338 patients with polycythemia vera: The impact of JAK2 (V617F) allele burden and leukocytosis on fibrotic or leukemic disease transformation and vascular complications. *Leukemia*. 2010;24(9):1574–1579.
60. Pardanani A, Lasho T, Finke C, et al. LNK mutation studies in blast-phase myeloproliferative neoplasms, and in chronic-phase disease with TET2, IDH, JAK2 or MPL mutations. *Leukemia*. 2010;24(10):1713–1718.
61. Ortmann CA, Kent DG, Nangalia J, et al. Effect of mutation order on myeloproliferative neoplasms. *N. Engl. J. Med.* 2015;372(7):601–612.

62. Delhommeau F, Dupont S, Della Valle V, et al. Mutation in TET2 in myeloid cancers. *N Engl J Med*. 2009;360(22):2289-2301.
63. Chen E, Schneider RK, Breyfogle LJ, et al. Distinct effects of concomitant Jak-2V617F expression and Tet2 loss in mice promote disease progression in myeloproliferative neoplasms. *Blood*. 2015;125(2):327-335.
64. Rumi E, Harutyunyan AS, Pietra D, et al. LNK mutations in familial myeloproliferative neoplasms. *Blood*. 2016;128(1):144-145.
65. Passamonti F, Thiele J, Girodon F, et al. A prognostic model to predict survival in 867 World Health Organization - Defined essential thrombocythemia at diagnosis: A study by the International Working Group on Myelofibrosis Research and Treatment. *Blood*. 2012;120(6):1197-1201.
66. Barbui T, Finazzi G, Carobbio A, et al. Development and validation of an International Prognostic Score of thrombosis in World Health Organization-essential thrombocythemia (IPSET-thrombosis). *Blood*. 2012;120(26):5128-5133.
67. Rumi E, Pietra D, Ferretti V, et al. JAK2 or CALR mutation status defines subtypes of essential thrombocythemia with substantially different clinical course and outcomes. *Blood*. 2014;123(10):1544-1551.
68. Tefferi A, Lasho TL, Finke CM, et al. CALR vs JAK2 vs MPL-mutated or triple-negative myelofibrosis: Clinical, cytogenetic and molecular comparisons. *Leukemia*. 2014;28(7):1472-1477.

69. Elala YC, Lasho TL, Gangat N, et al. Calreticulin variant stratified driver mutational status and prognosis in essential thrombocythemia. *Am. J. Hematol.* 2016;91(5):503–506.
70. Tefferi A, Lasho TL, Tischer A, Wassie EA, Finke CM, Belachew AA, Ketterling RP, Hanson CA PA. The prognostic advantage of calreticulin mutations in myelofibrosis might be confined to type 1 or type 1-like CALR variants. *Blood.* 2014;28(10):2106–2109.
71. Rotunno G, Mannarelli C, Guglielmelli P, et al. Impact of calreticulin mutations on clinical and hematological phenotype and outcome in essential thrombocythemia. *Blood.* 2014;123(10):1552–1555.
72. Tefferi A, Lasho TL, Finke C, et al. Type 1 vs type 2 calreticulin mutations in primary myelofibrosis: Differences in phenotype and prognostic impact. *Leukemia.* 2014;28(7):1568–1570.
73. Pietra D, Rumi E, Ferretti V V., et al. Differential clinical effects of different mutation subtypes in CALR-mutant myeloproliferative neoplasms. *Leukemia.* 2016;30(2):431–438.
74. Guglielmelli P, F. B, J. S, et al. EZH2 mutational status predicts poor survival in myelofibrosis. *Blood.* 2011;118(19):5227–5234.

75. Tefferi A, Vannucchi AM. Genetic Risk Assessment in Myeloproliferative Neoplasms. *Mayo Clin. Proc.* 2017;92(8):1283–1290.
76. Tefferi A. Novel mutations and their functional and clinical relevance in myeloproliferative neoplasms: JAK2, MPL, TET2, ASXL1, CBL, IDH and IKZF1. *Leukemia.* 2010;24(6):1128–1138.
77. Zhang SJ, Rampal R, Manshouri T, et al. Genetic analysis of patients with leukemic transformation of myeloproliferative neoplasms shows recurrent SRSF2 mutations that are associated with adverse outcome. *Blood.* 2012;119(19):4480–4485.
78. Rumi E, Cazzola M. Advances in understanding the pathogenesis of familial myeloproliferative neoplasms. *Br. J. Haematol.* 2017;(April):689–698.
79. Ranjan A, Penninga E, Am J, Hc H, Ow B. Inheritance of the chronic myeloproliferative neoplasms . A systematic review. 2013;(13):99–107.
80. Landgren O, Goldin LR, Kristinsson SY, et al. Increased risks of polycythemia vera, essential thrombocythemia, and myelofibrosis among 24 577 first-degree relatives of 11 039 patients with myeloproliferative neoplasms in Sweden. *Blood.* 2008;112(6):2199–2204.
81. Rumi E, Passamonti F, Della Porta MG, et al. Familial chronic myeloproliferative disorders: Clinical phenotype and evidence of disease anticipation. *J. Clin. Oncol.* 2007;25(35):5630–5635.

82. Olcaydu D, Harutyunyan A, Jäger R, et al. A common JAK2 haplotype confers susceptibility to myeloproliferative neoplasms. *Nat. Genet.* 2009;41(4):450–454.
83. Lasho TL, Pardanani A, Mcclure RF, et al. Concurrent MPL 515 and JAK2 V617F mutations in myelofibrosis : chronology of clonal emergence and changes in mutant allele burden over time. 2006;683–687.
84. Lambert JR, Everington T, Linch DC, Gale RE. In essential thrombocythemia, multiple JAK2-V617F clones are present in most mutant-positive patients: A new disease paradigm. *Blood.* 2009;114(14):3018–3023.
85. Saliba J, Saint-martin C, Stefano A Di, et al. Germline duplication of ATG2B and GSKIP predisposes to familial myeloid malignancies. 2015;(August).
86. Harutyunyan AS, Giambruno R, Krendl C, et al. Germline RBBP6 mutations in familial myeloproliferative neoplasms. *Blood.* 2016;127(3):362–365.
87. Loscocco, G.G., Mannarelli, C., Pacilli, A., Fanelli, T., Rotunno, G., Gesullo, F., Corbizi-Fattori, G., Vannucchi, A.M. & Guglielmelli P (2016). Germline transmission of LNKE208Q variant in a family with myeloproliferative neoplasms. *Am. J. Hematol.* 2016;91(9):356.
88. Oh ST, Simonds EF, Jones C, et al. Novel mutations in the inhibitory adaptor protein LNK drive JAK-STAT signaling in patients with myeloproliferative neoplasms. *Blood.* 2010;116(6):988–992.

89. Pandey JP. Genomewide association studies and assessment of risk of disease [7]. *N. Engl. J. Med.* 2010;363(21):2076–2077.
90. Tapper W, Jones A V., Kralovics R, et al. Genetic variation at MECOM, TERT, JAK2 and HBS1L-MYB predisposes to myeloproliferative neoplasms. *Nat. Commun.* 2015;6:1–11.
91. Roland J, Harutyunyan AS, Rumi E, et al. Common germline variation at the TERT locus contributes to familial clustering of myeloproliferative neoplasms. 2014;89(12):1107–1110.
92. Hinds DA, Barnholt KE, Mesa RA, et al. Germ line variants predispose to both JAK2 V617F clonal hematopoiesis and myeloproliferative neoplasms. *Blood.* 2016;128(8):1121–1128.
93. Varricchio L, Masselli E, Alfani E, et al. The dominant negative β isoform of the glucocorticoid receptor is uniquely expressed in erythroid cells expanded from polycythemia vera patients. *Blood.* 2011;118(2):425–436.
94. Jones A V., Chase A, Silver RT, et al. JAK2 haplotype is a major risk factor for the development of myeloproliferative neoplasms. *Nat. Genet.* 2009;41(4):446–449.
95. Kilpivaara O, Mukherjee S, Schram AM, et al. A germline JAK2 SNP is associated with predisposition to the development of JAK2V617F-positive myeloproliferative neoplasms. *Nat. Genet.* 2009;41(4):455–459.

96. Anelli L, Zagaria A, Specchia G, Albano F. The JAK2 GGCC (46 / 1) Haplotype in Myeloproliferative Neoplasms : Causal or Random ? 2018;1–12.
97. Hermouet S, Vilaine M. The JAK2 46/1 haplotype: A marker of inappropriate myelomonocytic response to cytokine stimulation, leading to increased risk of inflammation, myeloid neoplasm, and impaired defense against infection? *Haematologica*. 2011;96(11):1575–1579.
98. Jones A V., Campbell PJ, Beer PA, et al. The JAK2 46/1 haplotype predisposes to MPL-mutated myeloproliferative neoplasms. *Blood*. 2010;115(22):4517–4523.
99. Olcaydu D, Skoda RC, Looser R, et al. The “GGCC” haplotype of JAK2 confers susceptibility to JAK2 exon 12 mutation-positive polycythemia vera. *Leukemia*. 2009;23(10):1924–1926.
100. Li S, Kralovics R, De Libero G, et al. Clonal heterogeneity in polycythemia vera patients with JAK2 exon12 and JAK2-Y617F mutations. *Blood*. 2008;111(7):3863–3866.
101. Hussein K, Bock O, Seegers A, Flashove M. Myelofibrosis evolving during imatinib treatment of a chronic myeloproliferative disease with coexisting BCR-ABL translocation and JAK2V617F mutation. *Blood*. 2007;109(9):4106.

102. Tefferi A, Lasho TL, Patnaik MM, et al. JAK2 germline genetic variation affects disease susceptibility in primary myelofibrosis regardless of V617F mutational status: Nullizygoty for the JAK2 46/1 haplotype is associated with inferior survival. *Leukemia*. 2010;24(1):105–109.
103. Pietra D, Casetti I, Da Vià MC, et al. JAK2 GGCC haplotype in MPL mutated myeloproliferative neoplasms. *Am. J. Hematol*. 2012;87(7):746–747.
104. Soler G, Bernal-Vicente A, Antón AI, et al. The JAK2 46/1 haplotype does not predispose to CALR-mutated myeloproliferative neoplasms. *Ann. Hematol*. 2015;94(5):789–794.
105. Alvarez-larrán A, Angona A, Martínez-avilés L, Bellosillo B, Besses C. Influence of JAK2 46 / 1 haplotype in the natural evolution of JAK2V617F allele burden in patients with myeloproliferative neoplasms. *Leuk. Res*. 2012;36(3):324–326.
106. Tefferi A, Lasho TL, Mudireddy M, et al. The germline JAK2 GGCC (46/1) haplotype and survival among 414 molecularly-annotated patients with primary myelofibrosis. *Am. J. Hematol*. 2019;94(3):299–305.
107. Tefferi A, Lasho TL, Patnaik MM, et al. JAK2 germline genetic variation affects disease susceptibility in primary myelofibrosis regardless of V617F mutational status: Nullizygoty for the JAK2 46/1 haplotype is associated with inferior survival. *Leukemia*. 2010;24(1):105–109.

108. Nahajevszky S, Andrikovics H, Batai A, et al. The prognostic impact of germline 46 / 1 haplotype of Janus kinase 2 in cytogenetically normal acute myeloid leukemia. *Haematologica*. 2011;96(11):1613–1618.
109. Percy MJ, Rumi E. Genetic origins and clinical phenotype of familial and acquired erythrocytosis and thrombocytosis. *Am. J. Hematol*. 2009;84(1):46–54.
110. De La Chapelle A, Träskelin AL, Juvonen E. Truncated erythropoietin receptor causes dominantly inherited benign human erythrocytosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A*. 1993;90(10):4495–4499.
111. Ang SO, Chen H, Hirota K, et al. Disruption of oxygen homeostasis underlies congenital Chuvash polycythemia. *Nat. Genet*. 2002;32(4):614–621.
112. Camps C, Petousi N, Bento C, et al. Gene panel sequencing improves the diagnostic work-up of patients with idiopathic erythrocytosis and identifies new mutations. *Haematologica*. 2016;101(11):1306–1318.
113. Liu K, Kralovics R, Rudzki Z, et al. A de novo splice donor mutation in the thrombopoietin gene causes hereditary thrombocythemia in a Polish family. *Haematologica*. 2008;93(5):706–714.
114. Ding J, Komatsu H, Wakita A, et al. Familial essential thrombocythemia associated with a dominant-positive activating mutation of the c-MPL gene, which encodes for the receptor for thrombopoietin. *Blood*. 2004;103(11):4198–4200.

115. Mead AJ, Rugless M, Jacobsen S, Schuh A. Germline JAK2 Mutation in a Family with Hereditary Thrombocytosis. *N. Engl. J. Med.* 2012;366(10):967–969.
116. Lander ES, Linton LM, Birren B, et al. Initial sequencing and analysis of the human genome: International Human Genome Sequencing Consortium. *Nature.* 2001;412(6846):565–566.
117. Craig Venter J, Adams MD, Myers EW, et al. The sequence of the human genome. *Science* (80-.). 2001;291(5507):1304–1351.
118. Altshuler DL, Durbin RM, Abecasis GR, et al. A map of human genome variation from population-scale sequencing. *Nature.* 2010;467(7319):1061–1073.
119. International HapMap Consortium. The International HapMap Project. *Nature.* 2003;426(6968):789–796.
120. Dunham I, Kundaje A, Aldred SF, et al. An integrated encyclopedia of DNA elements in the human genome. *Nature.* 2012;489(7414):57–74.
121. Krijger PHL, De Laat W. Regulation of disease-associated gene expression in the 3D genome. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2016;17(12):771–782.
122. Paul DS, Soranzo N, Beck S. Functional interpretation of non-coding sequence variation: Concepts and challenges. *BioEssays.* 2014;36(2):191–199.

123. Maurano MT, Humbert R, Rynes E, et al. Systematic localization of common disease-associated variation in regulatory DNA. *Science* (80-.). 2012;337(6099):1190–1195.
124. Rowley MJ, Corces VG. Organizational principles of 3D genome architecture. *Nat. Rev. Genet.* 2018;19(12):789–800.
125. Schmitt AD, Hu M, Ren B. Genome-wide mapping and analysis of chromosome architecture. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2016;17(12):743–755.
126. Brackey CA, Marenduzzo D, Gilbert N. Mechanistic modeling of chromatin folding to understand function. *Nat. Methods.* 2020.
127. Li Y, Tao T, Du L, Zhu X. Three-dimensional genome: developmental technologies and applications in precision medicine. *J. Hum. Genet.* 2020;65(6):497–511.
128. Splinter E, de Wit E, van de Werken HJG, Klous P, de Laat W. Determining long-range chromatin interactions for selected genomic sites using 4C-seq technology: From fixation to computation. *Methods.* 2012;58(3):221–230.
129. Li MM, Datto M, Duncavage EJ, et al. Standards and Guidelines for the Interpretation and Reporting of Sequence Variants in Cancer: A Joint Consensus Recommendation of the Association for Molecular Pathology, American Society of Clinical Oncology, and College of American Pathologists. *J. Mol. Diagnostics.* 2017;19(1):4–23.

130. Rothberg JM, Hinz W, Rearick TM, et al. An integrated semiconductor device enabling non-optical genome sequencing. *Nature*. 2011;475(7356):348–352.
131. Thermofisher Scientific. TaqMan Assays for genetic variation research. 2018.
132. Wood TJJ, Silva D, Lobie PE, et al. Specificity of transcription enhancement via the STAT responsive element in the serine protease inhibitor 2.1 promoter. *Mol. Cell. Endocrinol.* 1997;130(1–2):69–81.
133. Li G, Cai L, Chang H, et al. Chromatin interaction analysis with paired-end tag (ChIA-PET) sequencing technology and application. *BMC Genomics*. 2014;15(Suppl 12):1–10.
134. Koressaar T, Remm M. Enhancements and modifications of primer design program Primer3. *Bioinformatics*. 2007;23(10):1289–1291.
135. Untergasser A, Cutcutache I, Koressaar T, et al. Primer3—new capabilities and interfaces. *Nucleic Acids Res.* 2012;40(15):e115–e115.
136. Langmead B, Trapnell C, Pop M, Salzberg SL. Ultrafast and memory-efficient alignment of short DNA sequences to the human genome. *Genome Biol.* 2009;10(3):R25.
137. Irastorza-Azcarate I, Acemel RD, Tena JJ, et al. 4Cin: A computational pipeline for 3D genome modeling and virtual Hi-C analyses from 4C data. *PLoS Comput. Biol.* 2018;14(3):1–20.

138. Acemel RD, Tena JJ, Irastorza-Azcarate I, et al. A single three-dimensional chromatin compartment in amphioxus indicates a stepwise evolution of vertebrate Hox bimodal regulation. *Nat. Genet.* 2016;48(3):336–341.
139. Russel D, Lasker K, Webb B, et al. Putting the pieces together: Integrative modeling platform software for structure determination of macromolecular assemblies. *PLoS Biol.* 2012;10(1):1–5.
140. Stegelmann F, Bullinger L, Griesshammer M, et al. High-resolution single-nucleotide polymorphism array-profiling in myeloproliferative neoplasms identifies novel genomic aberrations. *Haematologica.* 2010;95(4):666–669.
141. Feenstra JDM, Nivarthi H, Gisslinger H, et al. Whole-exome sequencing identifies novel MPL and JAK2 mutations in triple-negative myeloproliferative neoplasms. *Blood.* 2016;127(3):325–332.
142. Roberts KG, Li Y, Payne-Turner D, et al. Targetable kinase-activating lesions in Ph-like acute lymphoblastic leukemia. *N. Engl. J. Med.* 2014;371(11):1005–1015.
143. Zhang J, Mullighan CG, Harvey RC, et al. Key pathways are frequently mutated in high-risk childhood acute lymphoblastic leukemia: A report from the Children's Oncology Group. *Blood.* 2011;118(11):3080–3087.
144. Lucie Lanikova,¹⁻³ Olga Babosova,³ Sabina Swierczek,^{1,2} Linghua Wang,⁴ David A. Wheeler,⁴ Vladimir Divoky,^{5,6} Vladimir Korinek,³ and Josef T. Prchal^{1,2,7}. Coexistence of gain-of-function JAK2 germ line mutations with JAK2V617F in polycythemia vera. *Blood.* 2016;128(18):2266–2269.

145. Benton CB, Boddu PC, DiNardo CD, et al. Janus kinase 2 variants associated with the transformation of myeloproliferative neoplasms into acute myeloid leukemia. *Cancer*. 2019;125(11):1855–1866.
146. Maslah N, Verger E, Schlageter MH, et al. Next-generation sequencing for JAK2 mutation testing: advantages and pitfalls. *Ann. Hematol.* 2019;98(1):111–118.
147. Kjær L, Westman M, Riley CH, et al. A highly sensitive quantitative real-time pcr assay for determination of mutant jak2 exon 12 allele burden. *PLoS One*. 2012;7(3):7–14.
148. Cabagnols X, Favale F, Pasquier F, et al. Presence of atypical thrombopoietin receptor (MPL) mutations in triple-negative essential thrombocythemia patients. *Blood*. 2016;127(3):333–342.
149. Lim KH, Chang YC, Gon-Shen Chen C, et al. Frequent CALR exon 9 alterations in JAK2 V617F-mutated essential thrombocythemia detected by high-resolution melting analysis. *Blood Cancer J.* 2015;5(3):5–8.
150. Chong-Yun Xing 1, Hai-Ying Li 2, Jian-Bo Wu 2 S-MG 2. Co-occurrence of JAK2 V617F and an uncommon CALR del (p.K368fs*51) mutation facilitates JAK2/STAT signaling in polycythemia vera. *Leuk Lymphoma*. 2016;57(7):1743–1745.
151. Duncavage EJ, Tandon B. The utility of next-generation sequencing in diagnosis and monitoring of acute myeloid leukemia and myelodysplastic syndromes. *Int. J. Lab. Hematol.* 2015;37(S1):115–121.

152. Alonso CM, Llop M, Sargas C, et al. Clinical Utility of a Next-Generation Sequencing Panel for Acute Myeloid Leukemia Diagnostics. *J. Mol. Diagnostics*. 2019;21(2):228–240.
153. Bacher U, Shumilov E, Flach J, et al. Challenges in the introduction of next-generation sequencing (NGS) for diagnostics of myeloid malignancies into clinical routine use. *Blood Cancer J*. 2018;8(11).
154. Yang F, Anekpuritanang T, Press RD. Clinical Utility of Next-Generation Sequencing in Acute Myeloid Leukemia. *Mol. Diagnosis Ther*. 2020;24(1):1–13.
155. Alduaij W, McNamara CJ, Schuh A, et al. Clinical Utility of Next-generation Sequencing in the Management of Myeloproliferative Neoplasms. *HemaSphere*. 2018;2(3):e44.
156. Bento C, McMullin MF, Percy M CH. Primary Familial and Congenital Polycythemia. *GeneReviews®. Seattle Univ. Washington, Seattle*; 1993. 1993.
157. Percy MJ, Zhao Q, Flores A, et al. A family with erythrocytosis establishes a role for prolyl hydroxylase domain protein 2 in oxygen homeostasis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A*. 2006;103(3):654–659.
158. Piazza R, Valletta S, Winkelmann N, et al. Recurrent SETBP1 mutations in atypical chronic myeloid leukemia. *Nat. Genet*. 2013;45(1):18–24.

159. Tefferi A, Lasho TL, Finke CM, et al. ORIGINAL ARTICLE CALR vs JAK2 vs MPL -mutated or triple-negative myelofibrosis : clinical , cytogenetic and molecular comparisons. 2014;28(7):1472–1477.
160. Alvarez-Larrán A, Pereira A, Guglielmelli P, et al. Antiplatelet therapy versus observation in low-risk essential thrombocythemia with a CALR mutation. *Haematologica*. 2016;101(8):926–931.
161. Al Assaf C, Van Obbergh F, Billiet J, et al. Analysis of phenotype and outcome in essential thrombocythemia with CALR or JAK2 mutations. *Haematologica*. 2015;100(7):893–897.
162. Guglielmelli P, Rotunno G, Fanelli T, et al. Validation of the differential prognostic impact of type 1/type 1-like versus type 2/type 2-like CALR mutations in myelofibrosis. *Blood Cancer J*. 2015;5(10):2–4.
163. Haider M, Elala YC, Gangat N, Hanson CA, Tefferi A. MPL mutations and palpable splenomegaly are independent risk factors for fibrotic progression in essential thrombocythemia. *Blood Cancer J*. 2016;6(10):3–4.
164. Alvarez-Larran A, Martínez D, Arenillas L, et al. Essential thrombocythaemia with mutation in MPL : clinicopathological correlation and comparison with JAK 2V617F-mutated and CALR- mutated genotypes. *J. Clin. Pathol*. 2018;jclinpath-2018-205227.
165. Lundberg P, Karow A, Nienhold R, et al. Clonal evolution and clinical correlates of somatic mutations in myeloproliferative neoplasms. *Blood*. 2014;123(14):2220–2228.

166. Guglielmelli P, Lasho TL, Rotunno G, et al. The number of prognostically detrimental mutations and prognosis in primary myelofibrosis: An international study of 797 patients. *Leukemia*. 2014;28(9):1804–1810.
167. Courtier F, Carbuccia N, Garnier S, et al. Genomic analysis of myeloproliferative neoplasms in chronic and acute phases. *Haematologica*. 2017;102(1):e11–e14.
168. Jaiswal S, Fontanillas P, Flannick J, et al. Age-related clonal hematopoiesis associated with adverse outcomes. *N. Engl. J. Med.* 2014;371(26):2488–2498.
169. Genovese G, Kähler AK, Handsaker RE, et al. Clonal hematopoiesis and blood-cancer risk inferred from blood DNA sequence. *N. Engl. J. Med.* 2014;371(26):2477–2487.
170. Steensma DP, Bejar R, Jaiswal S, et al. Perspectives Clonal hematopoiesis of indeterminate potential and its distinction from myelodysplastic syndromes. 2019;126(1):9–17.
171. Jaiswal S, Natarajan P, Silver AJ, et al. Clonal Hematopoiesis and risk of atherosclerotic cardiovascular disease. *N. Engl. J. Med.* 2017;377(2):111–121.
172. Fuster JJ, MacLauchlan S, Zuriaga MA, et al. Clonal hematopoiesis associated with TET2 deficiency accelerates atherosclerosis development in mice. *Science* (80-.). 2017;355(6327):842–847.
173. Tefferi A, Elliott M. Thrombosis in myeloproliferative disorders: Prevalence, prognostic factors, and the role of leukocytes and JAK2V617F. *Semin. Thromb. Hemost.* 2007;33(4):313–320.

174. Segura-Díaz A, Stuckey R, Florido Y, et al. Thrombotic risk detection in patients with polycythemia vera: The predictive role of DNMT3A/TET2/ASXL1 mutations. *Cancers (Basel)*. 2020;12(4):1–9.
175. Cerquozzi S, Barraco D, Lasho T, et al. Risk factors for arterial versus venous thrombosis in polycythemia vera: A single center experience in 587 patients /692/499 /692/699/1541/1990/2331 article. *Blood Cancer J*. 2017;7(12):0–6.
176. Milosevic Feenstra JD, Nivarthi H, Gisslinger H, et al. Whole-exome sequencing identifies novel MPL and JAK2 mutations in triple-negative myeloproliferative neoplasms. *Blood*. 2016;127(3):325–332.
177. Angona A, Fernández-Rodríguez C, Alvarez-Larrán A, et al. Molecular characterisation of triple negative essential thrombocythaemia patients by platelet analysis and targeted sequencing. *Blood Cancer J*. 2016;6(8):e463.
178. Ju M, Fu R, Li H, et al. Mutation profiling by targeted sequencing of “triple-negative” essential thrombocythaemia patients. *Br. J. Haematol*. 2018;181(6):857–860.
179. Acha P, Xandri M, Fuster-Tormo F, et al. Diagnostic and prognostic contribution of targeted NGS in patients with triple-negative myeloproliferative neoplasms. *Am. J. Hematol*. 2019;94(10):E264–E267.
180. Chang Y, Lin H, Chiang Y. Targeted next-generation sequencing identified novel mutations in triple-negative myeloproliferative neoplasms. *Med. Oncol*. 2017;34(5):1–6.

181. Li F, Li W, Liu Y, et al. Effects of the I682F mutation on JAK2's activity, structure and stability. *Int. J. Biol. Macromol.* 2015;79:118–125.
182. Schulze S, Stengel R, Jaekel N, et al. Concomitant and noncanonical JAK2 and MPL mutations in JAK2V617F- and MPLW515 L-positive myelofibrosis. *Genes Chromosom. Cancer.* 2019;58(11):747–755.
183. Schnittger S, Bacher U, Haferlach C, et al. Characterization of 35 new cases with four different MPLW515 mutations and essential thrombocytosis or primary myelofibrosis. *Haematologica.* 2009;94(1):141–144.
184. Chaligné R, Tonetti C, Besancenot R, et al. New mutations of MPL in primitive myelofibrosis: Only the MPL W515 mutations promote a G1/S-phase transition. *Leukemia.* 2008;22(8):1557–1566.
185. Boyd EM, Bench AJ, Goday-Fernández A, et al. Clinical utility of routine MPL exon 10 analysis in the diagnosis of essential thrombocythaemia and primary myelofibrosis: Research paper. *Br. J. Haematol.* 2010;149(2):250–257.
186. Varghese LN, Defour JP, Pecquet C, Constantinescu SN. The thrombopoietin receptor: Structural basis of traffic and activation by ligand, mutations, agonists, and mutated calreticulin. *Front. Endocrinol. (Lausanne).* 2017;8(MAR):1–13.
187. Vainchenker W, Plo I, Marty C, Varghese LN, Constantinescu SN. The role of the thrombopoietin receptor MPL in myeloproliferative neoplasms: recent findings and potential therapeutic applications. *Expert Rev. Hematol.* 2019;12(6):437–448.

188. Pietra D, Brisci A, Rumi E, et al. Deep sequencing reveals double mutations in cis of MPL exon 10 in myeloproliferative neoplasms. *Haematologica*. 2011;96(4):607–611.
189. Levy G, Chu C, Benjamin F, et al. MPL Mutations in Essential Thrombocythemia Uncover A Common Path of Activation with Eltrombopag Dependent on W491 MPL Mutations in Essential Thrombocythemia Uncover A Common Path of Activation with Eltrombopag Dependent on W491 Universite' catholique de. *Blood*. 2020.
190. Bridgford JL, Lee SM, Lee CMM, et al. Novel drivers and modifiers of MPL-dependent oncogenic transformation identified by deep mutational scanning. *Blood*. 2020;135(4):287–292.
191. Ghilardi N, Skoda R. A Single-Base Deletion in the Thrombopoietin (TPO) Gene Causes Familial Essential Thrombocythemia Through a Mechanism of More Efficient Translation of TPO mRNA. *Blood*. 1999;1480–1482.
192. Rumi E, Harutyunyan AS, Casetti I, et al. A novel germline JAK2 mutation in familial myeloproliferative neoplasms. *Am. J. Hematol*. 2014;89(1):120–121.
193. Marty C, Saint-Martin C, Pecquet C, et al. Germ-line JAK2 mutations in the kinase domain are responsible for hereditary thrombocytosis and are resistant to JAK2 and HSP90 inhibitors. *Blood*. 2014;123(9):1372–1383.
194. Maie K, Yokoyama Y, Yano Y, et al. Progression to polycythemia vera from familial thrombocytosis with germline JAK2 R867Q mutation. *Ann. Hematol*. 2018;737–739.

195. Etheridge SL, Cosgrove ME, Sangkhae V, et al. A novel activating , germline JAK2 mutation , JAK2 R 564 Q, causes familial essential thrombocytosis. *Blood*. 2014;123(7):1059–1068.
196. Kapralova K, Horvathova M, Pecquet C, et al. Cooperation of germ line JAK2 mutations E846D and R1063H in hereditary erythrocytosis with megakaryocytic atypia. *Blood*. 2016;128(10):1418–1423.
197. Yoshimitsu M, Hachiman M, Uchida Y, et al. Essential thrombocytosis attributed to JAK2-T875N germline mutation. *Int. J. Hematol*. 2019;110(5):584–590.
198. Mullighan CG, Zhang J, Harvey RC, et al. JAK mutations in high-risk childhood acute lymphoblastic leukemia. *PNAS*. 2009;106(23):9414–9418.
199. Bercovich D, Ganmore I, Scott LM, et al. Mutations of JAK2 in acute lymphoblastic leukaemias associated with Down ' s syndrome. *Lancet*. 2008;372(9648):1484–1492.
200. Li F, Guo H, Wang M, et al. International Journal of Biological Macromolecules The effects of R683S (G) genetic mutations on the JAK2 activity , structure and stability. *Int. J. Biol. Macromol*. 2013;60:186–195.
201. Kearney L, Castro DG De, Yeung J, et al. Specific JAK2 mutation (JAK2 R683) and multiple gene deletions in Down syndrome acute lymphoblastic leukemia. *Blood*. 2009;113(3):646–648.
202. Wu Q, Guo H, Li F, et al. Disruption of E627 and R683 interaction is responsible for B-cell acute lymphoblastic leukemia caused by JAK2 R683G (S) mutations. *Leuk. Lymphoma*. 2013;54(99):2693–2700.

203. Labuhn M, Perkins K, Vyas P, et al. Mechanisms of Progression of Myeloid Preleukemia to Transformed Myeloid Leukemia in Children with Down Syndrome Article Mechanisms of Progression of Myeloid Preleukemia to Transformed Myeloid Leukemia in Children with Down Syndrome. *Cancer Cell*. 2019;(36):123–138.
204. Teofili L, Giona F, Torti L, et al. Hereditary thrombocytosis caused by MPL Ser505Asn is associated with a high thrombotic risk , splenomegaly and progression to bone marrow fibrosis. *Haematologica*. 2010;95(1):65–70.
205. Win AK, Reece JC, Dowty JG, et al. Risk of extracolonic cancers for people with biallelic and monoallelic mutations in MUTYH. *Int. J. Cancer*. 2016;139(7):1557–1563.
206. Raetz AG, David SS. When you're strange: Unusual features of the MUTYH glycosylase and implications in cancer. *DNA Repair (Amst)*. 2019;80(March):16–25.
207. Zhou Y, Sakurai H. Emerging and diverse functions of the EphA2 noncanonical pathway in cancer progression. *Biol. Pharm. Bull.* 2017;40(10):1616–1624.
208. Becker W. A wake-up call to quiescent cancer cells – potential use of DYRK1B inhibitors in cancer therapy. *FEBS J*. 2018;285(7):1203–1211.
209. Cho HS, Kelly JD, Hayami S, et al. Enhanced expression of EHMT2 is involved in the proliferation of cancer cells through negative regulation of SIAH1. *Neoplasia*. 2011;13(8):676–684.
210. Rada M, Vasileva E, Lezina L, et al. Human EHMT2/G9a activates p53 through methylation-independent mechanism. *Oncogene*. 2017;36(7):922–932.

211. Uchil PD, Hinz A, Siegel S, et al. TRIM Protein-Mediated Regulation of Inflammatory and Innate Immune Signaling and Its Association with Antiretroviral Activity. *J. Virol.* 2013;87(1):257–272.
212. Chen W, Lu C, Hong J. TRIM15 exerts anti-tumor effects through suppressing cancer cell invasion in gastric adenocarcinoma. *Med. Sci. Monit.* 2018;24:8033–8041.
213. Levy M, Shapiro H, Thaïss CA, Elinav E. NLRP6: A Multifaceted Innate Immune Sensor. *Trends Immunol.* 2017;38(4):248–260.
214. Kilpivaara O, Mukherjee S, Schram AM, et al. A germline JAK2 SNP is associated with predisposition to the development of JAK2 V617F -positive myeloproliferative neoplasms. 2009;41(4):455–459.
215. Pardanani A, Lasho TL, Finke CM, et al. The JAK2 46/1 haplotype confers susceptibility to essential thrombocythemia regardless of JAK2V617F mutational status—clinical correlates in a study of 226 consecutive patients. *Leukemia.* 2010;24(1):110–114.
216. Guglielmelli P, Biamonte F, Spolverini A, et al. Frequency and clinical correlates of JAK2 46/1 (GGCC) haplotype in primary myelofibrosis. *Leukemia.* 2010;24(8):1533–1537.
217. Naranbhai V, Kim S, Fletcher H, et al. The association between the ratio of monocytes: Lymphocytes at age 3 months and risk of tuberculosis (TB) in the first two years of life. *BMC Med.* 2014;12(1):2–7.

217. Naranbhai V, Kim S, Fletcher H, et al. The association between the ratio of monocytes: Lymphocytes at age 3 months and risk of tuberculosis (TB) in the first two years of life. *BMC Med.* 2014;12(1):2–7.
218. Yuan C, Li N, Mao X, et al. Elevated pretreatment neutrophil/white blood cell ratio and monocyte/lymphocyte ratio predict poor survival in patients with curatively resected non-small cell lung cancer: Results from a large cohort. *Thorac. Cancer.* 2017;8(4):350–358.
219. Chen H, Li M, Liu L, et al. Monocyte/lymphocyte ratio is related to the severity of coronary artery disease and clinical outcome in patients with non-ST-elevation myocardial infarction. *Medicine (Baltimore).* 2019;98(26):e16267.
220. Du J, Chen S, Shi J, et al. The association between the lymphocyte-monocyte ratio and disease activity in rheumatoid arthritis. *Clin. Rheumatol.* 2017;36(12):2689–2695.
221. Fernández-Ortiz A, Jiménez-Borreguero LJ, Peñalvo JL, et al. The progression and early detection of subclinical atherosclerosis (PESA) study: Rationale and design. *Am. Heart J.* 2013;166(6):990–998.
222. Sarni D, Sasaki T, Irony Tur-Sinai M, et al. 3D genome organization contributes to genome instability at fragile sites. *Nat. Commun.* 2020;11(1):1–12.
223. Makova KD, Hardison RC. The effects of chromatin organization on variation in mutation rates in the genome. *Nat. Rev. Genet.* 2015;16(4):213–223.

224. Schoenfelder S, Fraser P. Long-range enhancer–promoter contacts in gene expression control. *Nat. Rev. Genet.* 2019;20(8):437–455.
225. Fleischman AG, Aichberger KJ, Luty SB, et al. TNF α facilitates clonal expansion of JAK2V617F positive cells in myeloproliferative neoplasms. *Blood.* 2011;118(24):6392–6398.
226. Kleppe M, Kwak M, Koppikar P, et al. JAK-STAT pathway activation in malignant and nonmalignant cells contributes to MPN pathogenesis and therapeutic response. *Cancer Discov.* 2015;5(3):316–331.
227. Tefferi A, Vaidya R, Caramazza D, et al. Circulating interleukin (IL)-8, IL-2R, IL-12, and IL-15 levels are independently prognostic in primary myelofibrosis: A comprehensive cytokine profiling study. *J. Clin. Oncol.* 2011;29(10):1356–1363.
228. Pardanani A, Laborde RR, Lasho TL, et al. Safety and efficacy of CYT387, a JAK1 and JAK2 inhibitor, in myelofibrosis. *Leukemia.* 2013;27(6):1322–1327.
229. Mullally A, Brueedigam C, Poveromo L, et al. Depletion of Jak2V617F myeloproliferative neoplasm-propagating stem cells by interferon- α in a murine model of polycythemia vera. *Blood.* 2013;121(18):3692–3702.
230. Kiladjian JJ, Mesa RA, Hoffman R. The renaissance of interferon therapy for the treatment of myeloid malignancies. *Blood.* 2011;117(18):4706–4715.

231. Riley CH, Brimnes MK, Hansen M, et al. Interferon- α induces marked alterations in circulating regulatory T cells, NK cell subsets, and dendritic cells in patients with JAK2V617F-positive essential thrombocythemia and polycythemia vera. *Eur. J. Haematol.* 2016;97(1):83–92.
232. Hasselbalch HC, Holmström MO. Perspectives on interferon-alpha in the treatment of polycythemia vera and related myeloproliferative neoplasms: minimal residual disease and cure? *Semin. Immunopathol.* 2019;41(1):5–19.
233. Chen J, Jiang CC, Jin L, Zhang XD. Regulation of PD-L1: A novel role of pro-survival signalling in cancer. *Ann. Oncol.* 2016;27(3):409–416.
234. Okazaki T, Honjo T. PD-1 and PD-1 ligands: From discovery to clinical application. *Int. Immunol.* 2007;19(7):813–824.
235. Boussiotis VA. Molecular and biochemical aspects of the PD-1 checkpoint pathway. *N. Engl. J. Med.* 2016;375(18):1767–1778.
236. Latchman Y, Wood CR, Chernova T, et al. PD-L2 is a second ligand for PD-1 and inhibits T cell activation. *Nat. Immunol.* 2001;2(3):261–268.
237. Freeman GJ, Long AJ, Iwai Y, et al. Engagement of the PD-1 immunoinhibitory receptor by a novel B7 family member leads to negative regulation of lymphocyte activation. *J. Exp. Med.* 2000;192(7):1027–1034.

238. Nishimura H, Nose M, Hiai H, Minato N, Honjo T. Development of lupus-like autoimmune diseases by disruption of the PD-1 gene encoding an ITIM motif-carrying immunoreceptor. *Immunity*. 1999;11(2):141–151.
239. Pardoll DM. The blockade of immune checkpoints in cancer immunotherapy. *Nat. Rev. Cancer*. 2012;12(4):252–264.
240. Prestipino A, Emhardt AJ, Aumann K, et al. Oncogenic JAK2 V617F causes PD-L1 expression, mediating immune escape in myeloproliferative neoplasms. *Sci. Transl. Med.* 2018;10(429):1–13.
241. Mineo M, Lyons SM, Zdioruk M, et al. Tumor Interferon Signaling Is Regulated by a lncRNA INCR1 Transcribed from the PD-L1 Locus. *Mol. Cell*. 2020;78(6):1207–1223.e8.
242. Wang JC, Chen C, Kundra A, et al. Programmed Cell Death Receptor (PD-1) Ligand (PD-L1) expression in Philadelphia chromosome-negative myeloproliferative neoplasms. *Leuk. Res.* 2019;79(February 2019):52–59.
243. Sørensen AL, Bjørn ME, Riley CH, et al. B-cell frequencies and immunoregulatory phenotypes in myeloproliferative neoplasms: influence of ruxolitinib, interferon- α 2, or combination treatment. *Eur. J. Haematol.* 2019;2(April):1–11.
244. Arrieta O, Montes-Servín E, Hernandez-Martinez JM, et al. Expression of PD-1/PD-L1 and PD-L2 in peripheral T-cells from non-small cell lung cancer patients. *Oncotarget*. 2017;8(60):101994–102005.

245. Brochez L, Meireson A, Chevolet I, et al. Challenging PD-L1 expressing cytotoxic T cells as a predictor for response to immunotherapy in melanoma. *Nat. Commun.* 2018;9(1):9–11.
246. Diskin B, Adam S, Cassini MF, et al. PD-L1 engagement on T cells promotes self-tolerance and suppression of neighboring macrophages and effector T cells in cancer. *Nat. Immunol.* 2020;21(4):442–454.
247. Martínez-Trillos A, Maffioli M, Colomer D, et al. Relationship between the 46/1 haplotype of the JAK2 gene and the JAK2 mutational status and allele burden, the initial findings, and the survival of patients with myelofibrosis. *Ann. Hematol.* 2014;93(5):797–802.
248. Hasselbalch HC. Chronic inflammation as a promotor of mutagenesis in essential thrombocythemia, polycythemia vera and myelofibrosis. A human inflammation model for cancer development? *Leuk. Res.* 2013;37(2):214–220.
249. Hasselbalch HC. Perspectives on chronic inflammation in essential thrombocythemia, polycythemia vera, and myelofibrosis: Is chronic inflammation a trigger and driver of clonal evolution and development of accelerated atherosclerosis and second cancer? *Blood.* 2012;119(14):3219–3225.
250. Tefferi A. Pathogenesis of myelofibrosis with myeloid metaplasia. *J. Clin. Oncol.* 2005;23(33):8520–8530.

LISTADO DE TABLAS

Tabla 1. Clasificación de las Neoplasias Mieloproliferativas según la OMS 2016.

Tabla 2. Criterios de la OMS 2016 para el diagnóstico de la Policitemia Vera.

Tabla 3. Criterios de la OMS 2016 para el Diagnóstico de la Trombocitemia Esencial.

Tabla 4. Criterios de la OMS 2016 para el Diagnóstico de la Mielofibrosis Primaria Prefibrótica/en Estadío Inicial.

Tabla 5. Criterios de la OMS 2016 para el Diagnóstico de la Mielofibrosis Primaria en Fase Fibrótica.

Tabla 6. Resumen de características clínicas y perfil mutacional de la serie global.

Tabla 7. Genes estudiados por PCR Cuantitativa en Tiempo Real.

Tabla 8. Secuencia de los *primers* utilizados para la secuenciación Sanger de pacientes.

Tabla 9. Panel de genes seleccionados incluyendo grupo funcional al que pertenecen además de locus secuenciados y número de amplicones.

Tabla 10. Anticuerpos y DAPI (4',6-diamidino-2-fenilindol) utilizados para el *sorting* celular.

Tabla 11. *Primers* de los *Viewpoints* utilizados en el experimento 4C-seq

Tabla 12. Características, evolución clínica y perfil mutacional de los pacientes secuenciados con y sin patología mieloide.

Tabla 13. Características, evolución clínica y perfil mutacional de los pacientes con Neoplasias Mieloproliferativas Clásicas a los que se realizó panel mieloide.

Tabla 14. Características, evolución clínica y perfil mutacional los pacientes con Trombocitemia Esencial Triple Negativa a los que se realizó panel mieloide.

Tabla 15. Mutaciones no canónicas en genes *driver* de Neoplasias Mieloproliferativas identificadas en nuestros pacientes.

Tabla 16. Variantes seleccionadas tras filtrado según Materiales y Métodos.

Tabla 17. Variantes seleccionadas tras filtrado en familia 1.

Tabla 18. Variantes seleccionadas tras filtrado en familia 2.

Tabla 19. Características clínicas y bioquímicas de la cohorte PESA en función del haplotipo de JAK2 en la visita 1.

Tabla 20. Tabla descriptiva de los resultados de hemograma de la cohorte de PESA en función del haplotipo de JAK2 en la visita 1.

Tabla 21. Relación de mutaciones germinales de JAK2 causantes de Trombocitosis Familiares descritas en la literatura.

LISTADO DE FIGURAS

Figura 1. Resumen tecnología Ion Torrent®.

Figura 2. Representación de la Tecnología de Identificación de Genotipos de SNP TaqMan®.

Figura 3. Ejemplo de haplotipado de JAK2.

Figura 4. Estrategia de análisis para realización de sorting celular.

Figura 5: Técnicas de Captura de Conformación Cromosómica.

Figura 6. Resumen de la técnica de Captura Circularizada de Conformación Cromosómica (4C-seq).

Figura 7. Captura del *Genome Browser* de UCSC con algunos de los *Viewpoints* diseñados (VP2-6, VP8 y VP10).

Figura 8. Supervivencia global en función del diagnóstico del paciente.

Figura 9. Supervivencia global en Neoplasias Mieloproliferativas Clásicas en función del perfil mutacional.

Figura 10. Supervivencia Global en pacientes con Trombocitemia Esencial en función de la presencia o no de resistencia a la hidroxycarbamida.

Figura 11. Supervivencia Libre de Progresión en Neoplasias Mieloproliferativas Clásicas en función del perfil mutacional.

Figura 12. Supervivencia libre de progresión en Trombocitemia Esencial con mutaciones vs sin ellas.

Figura 13. Supervivencia libre de Trombosis en la serie global en función del estado mutacional de TET2 y DNMT3A.

Figura 14. Supervivencia Libre de Trombosis en Neoplasias Mieloproliferativas en función de presencia o no de mutaciones en el gen DNMT3A.

Figura 15. Supervivencia libre de evento en Neoplasias Mieloproliferativas Clásicas en función del perfil mutacional.

Figura 16. Supervivencia global Trombocitemia Esencial Triple Negativa en función del número de mutaciones.

Figura 17. Supervivencia libre de Progresión en Trombocitemia Esencial Triple Negativa en función del perfil mutacional.

Figura 18. Imagen de IGV mostrando las mutaciones en *cis* 1513A>T (p.S505C) y c.1543T>C (p.W515R) del paciente con Trombocitemia Esencial.

Figura 19. Ensayo de luciferasa que muestra el incremento de actividad transcripcional de STAT5 en los dobles mutantes de MPL.

Figura 20. Ensayo de proliferación que muestra el incremento de la misma en los dobles mutantes de MPL.

Figura 21. Pedigrí de la familia con mutación en R683G de JAK2 y confirmación por secuenciación Sanger en sangre periférica y saliva

Figura 22. Ensayo de Luciferasa que muestra la cuantificación de la actividad de STAT5 en presencia de JAK2 normal y JAK2 R683G con y sin citoquinas y en presencia de ruxolitinib o sin ella.

Figura 23. Pedigrí de las familias estudiadas por WES.

Figura 24. Distribución de haplotipos de JAK2 en los 509 participantes analizados del estudio PESA.

Figura 25. Análisis de Enriquecimiento Génico utilizando la aplicación web Enrichr.

Figura 26. Perfiles de interacciones de cromatina de los VP 3, 8 y 5.

Figura 27. Perfiles de interacciones de cromatina de los VP 6 y 11

Figura 28. Modelo 3D y Virtual Hi-C realizado con los *viewpoints* 2-8 y 10 del experimento 4C-seq

Figura 29. RT-qPCRs de los genes PD-L1, PD-L2, JAK2 y KIAA1432 en distintos haplotipos según el tipo celular en sangre periférica de donantes sanos.

Figura 30. Supervivencia global de Mielofibrosis Primaria en función de mutaciones en genes *driver*.

Figura 31. Modelo de etiopatogenia de las Neoplasias Mieloproliferativas.

TERMINOLOGÍA INGLESA

A lo largo de esta Tesis Doctoral se ha utilizado la siguiente terminología en inglés con el objetivo de facilitar la comprensión de la misma o bien debido a su uso ampliamente extendido. Dichos términos se encuentran escritos en cursiva a lo largo de este texto.

Base calling: llamada de bases, obtención de datos crudos de secuenciación.

Blast: explosión, se refiere al cruce de secuencias con la secuencia de referencia.

Buffer: solución tampón.

Cluster: grupo o racimo.

Downregulado: con disminución de su expresión.

Fragment end: final de fragmento.

Frameshift: cambio de marco de lectura (en referencia a tipo de mutaciones).

Flow cell: celda de flujo, dispositivo donde ocurre la reacción de secuenciación con tecnología Illumina®.

Genome browser: navegador para el genoma.

Heatmap: mapa de calor (tipo de representación gráfica)

Mix: mezcla.

Nozzle: boquilla.

On-target: en el blanco, secuencias que alinean dentro de la región de interés

Output: Cantidad de datos que genera el secuenciador.

Pipeline: flujo de trabajo.

Paired-end: extremo emparejado, se refiere a secuenciación desde los dos extremos del fragmento.

Primer: cebador.

Running window: ventana corrida, se refiere a un tipo de análisis bioinformático.

Score: puntuación o índice.

Sorting: clasificación. Se refiere al proceso de separación celular por citometría.

Splicing: empalme. Se refiere a los mecanismos de corte y empalme dentro de los procesos de maduración post-transcripcional del RNA mensajero.

Upstream: por encima de.

Upregulado: con elevación de su expresión.

Viewpoint: punto de vista. Se refiere a la región que se estudia mediante el experimento 4C-seq.

Wild-type: salvaje o silvestre, se refiere a lo normal o al alelo más frecuente o no mutado.

ABREVIATURAS

3D: tridimensional.

3C: del inglés *Chromosome Conformation Capture*, es decir, captura de la conformación cromosómica.

4C-seq: del inglés *Circularized Chromosome Conformation Capture sequencing*, es decir, secuenciación de la captura circularizada de la conformación cromosómica.

A: adenina.

ACC: *American College of Cardiology*.

AHA: *American Heart Association*.

C: citosina.

cDNA: ácido desoxirribonucleico complementario.

CHCM: concentración de hemoglobina corpuscular media.

CHIP: del inglés *clonal hematopoiesis of indeterminate potential*, es decir, hematopoyesis clonal de potencial indeterminado.

CHR: cromosoma.

CV: cardiovascular.

DAPI: 4',6-diamidino-2-fenilindol.

DAT: genes DNMT3A, ASXL1 y TET2.

DIPSS: del inglés *Dynamic International Prognostic Score System*, es decir, Índice Pronóstico Dinámico Internacional.

DNA: ácido desoxirribonucleico.

ENCODE: del inglés *Encyclopedia of DNA Elements*, es decir, Enciclopedia de Elementos de DNA (se refiere al Proyecto o Consorcio ENCODE).

EPOR: receptor de eritropoyetina.

EV: del inglés *empty vector*, es decir, vector vacío.

FRCV: factores de riesgo cardiovascular.

FSC: del inglés *forward scatter channel*, es decir, canal de dispersión frontal.

G: guanina.

GCSFR: receptor del factor estimulante de colonias granulocíticas.

GIPSS: del inglés *Genetically Inspired Prognostic Scoring System*, es decir, Índice Pronóstico Inspirado en la Genética.

GWAS: del inglés *genome-wide association studies*, es decir, estudios globales de asociación del genoma.

HapMap: del inglés, *Haplotype Map*, es decir, mapa de haplotipos (se refiere al Proyecto o Consorcio HapMap).

HCM: hemoglobina corpuscular media.

HR: del inglés *hazard ratio*, es decir, cociente de riesgo.

IMC: índice de masa corporal.

IL-3: interleuquina 3.

IPSS: del inglés *International Prognostic Score System*, es decir, Índice Pronóstico Internacional.

Kb: kilobases.

LD block: del inglés, *linkage disequilibrium block*, bloque con desequilibrio de ligamiento (el que se hereda junto).

LMA: leucemia mieloide aguda.

LMC: leucemia mieloide crónica.

lncRNA: del inglés, *long non-coding RNA*, es decir, RNA largo no codificante.

mRNA: ácido ribonucleico mensajero.

MAF: del inglés *minor allele frequency*, es decir, frecuencia del alelo menor.

MDSC: del inglés, *myeloid derived suppressor cells*, es decir, células supresoras derivadas mieloides.

MF: mielofibrosis.

MFP: mielofibrosis primaria.

MFP-TN: mielofibrosis primaria triple negativa.

MFPPost-PV: Mielofibrosis Post-Policitemia Vera.

MIPSS70: del inglés *Mutation-Enhanced International Prognostic Score System for Transplantation-Age Patients*, es decir, índice pronóstico internacional mejorado con mutaciones para pacientes en edad de trasplante.

n: número de sujetos.

NGS: del inglés *next-generation sequencing*, secuenciación de nueva generación.

NMP: neoplasias mieloproliferativas.

NMP-TN: neoplasias mieloproliferativas triple negativas.

NMP-like: similar a neoplasias mieloproliferativas.

OMS: Organización Mundial de la Salud.

OR: del inglés *odds ratio*, es decir, razón de probabilidades.

pB: pares de bases.

PCR: del inglés, *polymerase chain reaction*, es decir, reacción en cadena de la polimerasa o también, según contexto, proteína C reactiva (valor analítico).

PESA: del inglés *Progression of Early Subclinical Atherosclerosis*.

PFA: paraformaldehído.

PSI: del inglés *pounds-force per square inch*, libra de fuerza por pulgada al cuadrado.

PV: policitemia vera.

SMD: síndrome mielodisplásico.

SMD/NMP: neoplasia mielodisplásica/mieloproliferativa.

T: timina.

TAD: tensión arterial diastólica.

TAS: tensión arterial sistólica.

TE: trombocitemia esencial.

TE-TN: trombocitemia esencial triple negativa.

TFS: del inglés *thrombosis free survival*, es decir, supervivencia libre de trombosis.

TPO: trombopoyetia.

TPOR: receptor de la trombopoyetina.

RDW: del inglés, *red blood distribution width*, ancho de distribución eritrocitaria.

RNA: ácido ribonucleico.

RNA-seq: del inglés *RNA sequencing*, secuenciación del RNA, se refiere a la secuenciación del transcriptoma entero.

RT-qPCR: del inglés *reverse transcription quantitative polymerase chain reaction*, es decir, reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa tras transcripción reversa.

SNP: del inglés, *single nucleotide polymorphism*, es decir, polimorfismo de un único nucleótido.

SSC: del inglés *side scatter channel*, es decir, canal de dispersión lateral.

UCSC: University of California de Santa Cruz.

VAF: del inglés *variant allele frequency*, es decir, frecuencia alélica de la variante.

VCM: volumen corpuscular medio.

VP: *viewpoint*.

vs: versus.

VSG: velocidad de sedimentación globular.

WES: del inglés *whole-exome sequencing*, es decir, secuenciación completa del genoma.

WT: del inglés *wild-type*.

